



Communauté française de Belgique
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
GEMBOUX AGRO-BIO TECH

**PRODUCTION ET CARACTERISATION D'HYDROLYSATS
DE PECTINE OBTENUS PAR VOIES ENZYMATIQUE ET
THERMIQUE (micro-ondes)**

COMBO Agnan Marie Michel

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences
agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur: Prof. Michel PAQUOT

Co-promoteur: Prof. Bernard WATHELET

2013

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que se soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc en violation de la dite loi.

COMBO Agnan Marie Michel (2013). Production et caractérisation d'hydrolysats de pectine obtenus par voies enzymatique et thermique (micro-ondes). Thèse de doctorat, Belgique: Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech.

Résumé

L'objectif de cette thèse est de contribuer à étudier d'une part les voies de production des oligosaccharides pectiques (POS) et d'autre part à déterminer leurs principales propriétés physico-chimiques. Pour ce faire, deux voies de production ont été utilisées : enzymatique et thermique. En ce qui concerne la production de POS par voie enzymatique, six pectinases commerciales de qualité alimentaire (Endopolygalacturonase-M2, Pectinase P-4716, Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L, Pectinase 62L et Macer8 FJ) ont été testées sur une pectine modèle (acide polygalacturonique) pour sélectionner la pectinase capable de produire au mieux des POS. Préalablement, la totalité de ces pectinases a été caractérisée en termes d'activité polygalacturonase et de pureté: toutes possédaient une activité polygalacturonase, mais concernant la pureté, ces préparations commerciales se sont révélées être un mélange de plusieurs activités enzymatiques à l'exception de l'Endopolygalacturonase-M2 (EPG-M2). Cette dernière a présenté, après deux heures d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique, les meilleurs résultats pour la production de POS avec 18% et 58% de la masse convertie en acides di et tri-galacturoniques respectivement (contre 0,22 et 0,20% pour la Pectinase P-4716, 0,9 et 0,3% pour la Viscozyme, 2,7 et 9,4% pour la Pectinex Ultra SP-L, 0,4 et 0,3% pour la Pectinase 62L et 0,2 et 0,15% pour la Macer8 FJ). L'EPG-M2 a donc été choisie pour modifier la pectine de betterave dans la suite du travail. Ainsi, en utilisant l'EPG-M2 combinée à une pectine-méthylestérase (Rapidase Smart®), des poudres de POS ont été obtenues par lyophilisation après hydrolyse de la pectine de betterave. Une étude des propriétés chimiques et physico-chimiques de ces POS a été ensuite réalisée par chromatographie liquide haute performance, par analyse thermogravimétrique couplée à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, par analyse calorimétrique différentielle et par diffraction des rayons X. Les analyses chromatographiques ont montré que les POS sont composés de mélanges d'oligomères de masses moléculaires (M_w) diverses avec différentes teneurs en acide galacturonique. L'analyse thermique a toutefois révélé que les POS étaient plus sensibles à la dégradation thermique que la pectine native. L'analyse par ATG-IRTF n'a montré aucun changement majeur dans les groupes fonctionnels après hydrolyse enzymatique de la pectine de betterave. La diffraction RX des POS a indiqué une diminution de la cristallinité par rapport à la pectine native.

La seconde voie suivie pour la production de POS a été une voie hydro-thermique par utilisation de micro-ondes. Le potentiel des micro-ondes pour produire des POS a été exploré et les conditions optimales conduisant aux meilleures teneurs en POS ont été déterminées. Trois paramètres ont été simultanément étudiés: la température, le temps ainsi que le pH. Un plan expérimental a permis d'évaluer l'effet de ces paramètres sur la production de POS à partir d'une solution de pectine de betterave. Une diminution considérable de la M_w de la pectine de betterave a été observée avec des M_w correspondant à des oligosaccharides de degré de polymérisation (DP) moyen de l'ordre de 24 à 25. Les résultats de cette étude ont montré qu'un pH de 3, une durée supérieure à 15 min et une température comprise entre 140 et 148°C sont les conditions les plus favorables à l'obtention de POS. Ces deux voies d'hydrolyse de la pectine en POS pourraient représenter des méthodes pratiques et fiables pour une production en routine de POS, composés utilisables comme ingrédients additifs pouvant être incorporés dans des formulations alimentaires ayant des propriétés nutritionnelles et/ou technofonctionnelles.

COMBO Agnan Marie Michel (2013). Production and characterization of pectin hydrolysates obtained by enzymatic and thermal (microwaves) ways. PhD Thesis, Belgium: University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech.

Abstract:

The objective of this thesis is to contribute to study on the one hand the production ways of pectic oligosaccharides (POS) and on the other hand to determine their main physico-chemical properties. To do this, two production ways were used: thermal and enzymatic. Concerning enzymatically POS production, six commercial food grade pectinases (endopolygalacturonase-M2, Pectinase P-4716, Viscozyme L Pectinex Ultra SP-L, Pectinase 62L and Macer8 FJ) were tested on a model pectin (polygalacturonic acid) to select the best pectinase capable to produce POS. Previously, all of these pectinases were characterized in terms of polygalacturonase activity and purity: all had a polygalacturonase activity, but for purity these commercial preparations proved to be a mixture of several enzyme activities except endopolygalacturonase-M2 (EPG-M2). The latter presented, after two hours of polygalacturonic acid hydrolysis, the best results for the production of POS with 18% and 58% of the mass converted into acids di- and tri-galacturonic respectively (contrary to 0.22 and 0.20% for Pectinase P-4716, 0.9 and 0.3% for Viscozyme, 2.7 and 9.4% for the Pectinex Ultra SP-L, 0.4 and 0.3% for Pectinase 62L, and 0.2 and 0.15% for the Macer8 FJ). The EPG-M2 was therefore selected to modify sugar beet pectin in the rest of work. Thus, using the EPG-M2 combined with pectin methylesterase (Rapidase Smart®), POS powders were obtained by lyophilization after hydrolysis of sugar beet pectin. A study of the chemical and physico-chemical properties of these POS was then carried out by high performance liquid chromatography, thermogravimetric analysis coupled with Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. The chromatographic analysis showed that the POS were composed of mixtures of oligomers of molecular weights (M_w) with various different levels of galacturonic acid. Thermal analysis revealed that the POS were more sensitive to thermal degradation than the native pectin. Analysis by ATG-FTIR showed no major change in the functional groups after enzymatic hydrolysis of sugar beet pectin. The X-ray diffraction POS showed a decrease in crystallinity compared to the native pectin.

The second way for POS production was hydrothermal by using microwaves. The potential of microwaves to produce POS was investigated and the optimal conditions leading to the best POS levels were determined. Three parameters were studied simultaneously: temperature,

time and pH. An experimental design was used to evaluate the effect of these parameters on the production of POS from sugar beet pectin solution. A considerable decrease in the M_w of beet pectin was observed with some values corresponding to oligosaccharides with degree of polymerization (DP) of about 24 to 25. The results of this study showed that a pH of 3, a duration above 15 min and a temperature between 140 and 148°C are the most favorable conditions for obtaining POS.

These two ways of pectin hydrolysis into POS may represent practical and reliable methods for routine production of POS, which are usable compounds as additives than can be incorporated into food formulations having nutritional and/or technofunctional properties.

A la mémoire de mon père COMBO Kanga Michel
A ma mère BENIE Gnangon Bernadette

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Je voudrais avant tout remercier la République de Côte d'Ivoire, mon pays, via le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour la bourse d'étude. Je remercie aussi, tout particulièrement la fondation Œuvre Saint Justin (en Suisse) qui a bien voulu m'octroyer une aide financière pour poursuivre mes travaux pendant les moments difficiles de la crise socio-politique qu'a traversée mon pays. Merci aussi au service social de Gembloux AgroBio-Tech pour les prêts financiers pendant les retards que connaissait très souvent ma bourse d'étude.

J'adresse également mes remerciements appuyés au Professeur Michel Paquot, promoteur de cette thèse, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire et pour m'avoir guidée tout le long de ce travail. Merci Professeur pour votre remarquable disponibilité, vos pertinentes remarques et vos suggestions avisées.

De même, j'exprime ma grande gratitude au Professeur Bernard Wathelet, membre de mon comité de thèse pour avoir accepté, après le départ du Professeur Michel Paquot, de poursuivre le travail avec moi, en tant que co-promoteur de cette thèse. Je le remercie aussi pour la formation à la technique d'électrophorèse.

Je voudrais remercier également les autres membres du comité de thèse: les Professeur Jean-Paul Wathelet et Christophe Blecker pour leur disponibilité et leurs pertinentes critiques lors des différentes présentations de l'état d'avancement de mes travaux. Le Professeur Marie-Laure Fauconnier et le Docteur Aurore Richel pour avoir accepté d'être membre de mon comité de thèse. En outre, merci au Professeur Christophe Blecker pour avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de mon doctorat.

Je voudrais remercier Monsieur Pierre van Cutsem, Professeur à la Faculté Universitaire Nôtre Dame de la Paix (FUNDP) de Namur pour avoir accepté d'être rapporteur externe.

Je remercie aussi madame Christelle Robert pour son assistance et les différentes formations en HPLC qu'elle a bien voulu me donner au début de cette thèse.

J'exprime mes remerciements au Docteur Sabine Danthine de l'Unité de Science des Aliments et Formulation de Gembloux agro-Bio Tech pour son aide lors des analyses aux rayons X. Je remercie aussi Madame Lynn Doran pour sa précieuse aide au laboratoire.

Merci au Docteur Nicolas Quiévy de l'Unité de Chimie et de Physique des hauts polymères de l'Université Catholique de Louvain pour sa collaboration et son aide fort appréciable dans le traitement et l'analyse de certaines données de cette thèse.

Je tiens également à remercier tout le personnel (anciens comme nouveaux) de l'unité de Chimie Biologique Industrielle de Gembloux AgroBio-Tech pour leur sympathie. Il s'agit notamment de mesdames et messieurs: Eric Groignet, Maryse Hardenne, Pascal Laurent, Jean-Luc Wertz, Magalie Deleu, Dorothée Goffin, Caroline Vanderghem, Nadia Rabetafika, Julie Roiy, Catherine Chemotti, Virginie Byttebier, Laurence Meyer, Alexandre Schandeler, Thomas Bertrand, Frederic Meyer, Romain Thomas, Mathilde Simon, Olivia Denies, Sébastien Gillet, Emmanuelle François, Emmanuel Valpyn, Gaëtan Richard, une pensée toute particulière à Danielle Brunin (paix à son âme). J'adresse un grand merci à Isabelle Van De Vreken (affectueusement Ziza) pour son soutien sans faille et toujours prête à m'encourager et à me remonter le moral. Merci pour tout Ziza.

J'adresse des remerciements appuyés au Docteur Mario Aguedo pour sa grande et remarquable disponibilité toutes les fois que j'ai eu à le solliciter. Tes qualités scientifiques et humaines m'ont été d'un grand apport. Un grand merci à toi.

Mes remerciements vont également à l'endroit de messieurs Vincent Hotte et Danny Trisman pour leur disponibilité et leur joie de vivre.

Merci également à tous mes camarades docteurs(Francis Nsimba, Emmanuelle Escarnot, Augustin Moh) et doctorants(Nadine Galonde, Pauline Sainvitu, Khady Ba, Gaoussou karamoko, Charles Yapo, Yetioman Touré et Florian Tiappi) dont la sympathie et la bonne humeur m'ont permis d'évoluer dans un cadre amical et agréable.

Merci également à tous les étudiants ivoiriens regroupés au sein de l'ASETIB (Association des Etudiants Ivoiriens de Belgique) pour leur amitié et les bons moments passés ensemble en Belgique et particulièrement à Gembloux.

Je remercie spécialement tous les membres de ma famille pour leur soutien et pour leurs constants encouragements tout au long de ces années d'études. Merci particulièrement à ma mère chérie qui depuis la Côte d'Ivoire n'a cessé d'être pour moi une grande source d'encouragement et de motivation. Merci aussi à mon père (paix à son âme) qui aurait été très fière de moi aujourd'hui mais qui malheureusement m'a quittée trop tôt (que la volonté de Dieu soit faite). Merci à une amie de très longues dates, Madame Liliane Amon Tano, ma sœur et confidente. Merci à toi Liliane pour tes encouragements ; cette distance n'a fait que renforcer cette amitié qui nous lie depuis si longtemps.

Enfin, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma profonde gratitude au Docteur Olivier N'guessan Konan pour l'exceptionnel soutien et attention à mon égard.

LISTE DES ABREVIATIONS

GalA ou AGA	Acide galacturonique
AGU	Acide glucuronique
HG	Homogalacturonane
RG	Rhamnogalacturonane
Ara	Arabinose
Rha	Rhamnose
Gal	Galactose
Fuc	Fucose
Api	Apiose
Glc	Glucose
DiAGA	Acide digalacturonique
TriAGA	Acide trigalacturonique
Dha	Acide 3-déoxy-D-lyxoheptulosarique
Kdo	Acide 3-déoxy-D-mannoctulosonique
DM	Degré de méthylation
DA	Degré d'acétylation
HM	Pectines hautement méthylées
LM	Pectines faiblement méthylées
PPase	Protopectinase
PE ou PME	Pectinestérase ou pectineméthylestérase
PG	Polygalacturonase
PMG	Polyméthylgalacturonase
PGL	Polygalacturonate lyase
PMGL	Polyméthylgalacturonate lyase
Endo-PGase	Endo-polygalacturonase
EPG-M2	Endo-polygalacturonase M2
POS	Pectine oligosaccharides ou oligosaccharides pectiques
OGA	Oligogalacturonides
NDO	Oligosaccharides non digestibles
FOS	Fructooligosaccharides
Exo-PGase	Exo-polygalacturonase
RGase	Rhamnogalacturonase

Abf	Arabinofuranosidase
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DP _n	Degré de polymérisation moyen en nombre
M _w	Masse moléculaire moyenne en poids
<i>dn/dc</i>	Indice de polydispersité
η	Viscosité intrinsèque
R _g	Rayon de giration
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
Fr	Facteur de réponse
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécylsulfate sur gel de polyacrylamide
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
AGPs	Arabinogalactane-protéines
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
NaBH ₄	Borohydrure de Sodium
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
NH ₄ OH	Hydroxyde d'ammonium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaN ₃	Sodium azide
NaNO ₃	Nitrate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
HPSEC	Chromatographie d'exclusion de taille
RI	Détecteur à indice de réfraction
LS	Détecteur à diffusion de lumière à angle droit
HPAEC-PAD	Chromatographie échangeuse d'anions à haute performance couplée à un détecteur ampérométrique pulsé
HMF	5-hydroxymethyl furfural
2-F	Furfural ou furaldéhyde
AF	Acide férulique
ATG	Analyse thermogravimétrique
IR	Infrarouge
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier

ACD	Analyse calorimétrique différentielle
DRX	Diffraction des rayons X
Tg	Température de transition vitreuse
LogR'0	Facteur de sévérité combiné
RSM	Méthodologie des surfaces de réponses

Ecrits réalisés dans le cadre de cette thèse

A. Publications

Combo Agnan Marie Michel, Mario Aguedo, Nicolas Quiévy, Sabine Danthine, Dorothée Goffin, Nicolas Jacquet, Christophe Blecker, Jacques Devaux, Michel Paquot. 2013. Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 148-156.

Combo Agnan Marie Michel, Mario Aguedo, Dorothée Goffin, Michel Paquot. 2012. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 588-596.

Combo Agnan Marie Michel, Mario Aguedo, Michel Paquot. 2011. Les oligosaccharides pectiques: Production et applications possibles. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 15(1), 153-164.

B. Publication en préparation

Combo Agnan Marie Michel, Mario Aguedo, Michel Paquot. Production of pectic oligosaccharides from sugar beet pectin under microwave assisted autohydrolysis using response surface methodology (*en préparation*)

C. Communication poster

Emmanuelle François, Dorothée Goffin, **Agnan Marie Michel Combo**, Blaise Yannick, Jérôme Bindelle, Michel Paquot, Daniel Portetelle, André Thewis, Christelle Boudry. 2012. *In vitro* determination of prebiotic potential of sugar beet pulp extracted candidates and influence of production method. International Scientific Conference on Pro- and Pre-biotics, Kosice, Slovaquie, 12-14 June.

TABLE DES MATIERES

RESUME	I
ABSTRACT	III
REMERCIEMENTS	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
<i>I.1.1. Définition, description et classification des substances pectiques</i>	5
<i>I.1.2. Origine des substances pectiques</i>	6
<i>I.1.3. Structure moléculaire des pectines</i>	7
I.1.3.1. Homogalacturonane	8
I.1.3.2. Rhamnogalacturonane type I	8
I.1.3.3. Rhamnogalacturonane type II	10
<i>I.1.4. Propriétés des substances pectiques</i>	12
I.1.4.1. Solubilité des pectines.....	12
I.1.4.2. Stabilité des pectines.....	12
I.1.4.3. Viscosité des pectines	13
I.1.4.4. Gélification des pectines	13
<i>I.1.5. Intérêt des pectines</i>	14
I.2. PRODUCTION DES OLIGOSACCHARIDES PECTIQUES	15
<i>I.2.1. Les enzymes pectinolytiques</i>	15
I.2.1.1. Pectinestérases (PE) ou pectinéméthylestérases (PME)	16
I.2.1.2. Dépolymérase	17
I.2.1.2.1. Les polygalacturonases (PG)	18
I.2.1.2.2. Les lyases ou transéliminases	19
<i>I.2.2. Autres enzymes intervenant dans la dégradation des substances pectiques</i>	20
I.2.2.1. Rhamnogalacturonases	21
I.2.2.2. Arabinanases	21
I.2.2.3. Galactanases.....	22
<i>I.2.3. Producteurs d'enzymes pectinolytiques</i>	22
<i>I.2.4. Utilisations des enzymes pectinolytiques</i>	23
<i>I.2.5. Le réacteur micro-ondes</i>	25
I.2.5.1. Définition	26
I.2.5.2. Description et fonctionnement du réacteur micro-ondes	27
I.2.5.3. Facteurs intervenant lors de l'extraction par le micro-ondes	29
I.2.5.4. Utilisation des micro-ondes dans la production d'oligosaccharides.....	30
I.3. APPLICATIONS POTENTIELLES DES FRAGMENTS PECTIQUES	31
<i>I.3.1. Effet prébiotique des fragments pectiques</i>	31
<i>I.3.2. Utilisation des fragments pectiques dans le domaine de la santé</i>	31
<i>I.3.3. Application des fragments pectiques dans le domaine agricole</i>	32
I.4. CONCLUSION	33
OBJECTIFS ET STRATEGIE	35
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	41
II.1. MATÉRIELS	41
<i>II.1.1. Solvants et réactifs utilisés</i>	41

II.1.2. Substrats utilisés	42
II.1.3. Enzymes utilisées	42
II.2. MÉTHODES	43
II.2.1. Composition chimique des pectines.....	43
II.2.1.1. Détermination de la matière sèche.....	43
II.2.1.2. Dosage des monosaccharides par chromatographie gazeuse (CPG)	43
II.2.1.3. Dosage de l'acide galacturonique par chromatographie échangeuse d'anions	45
II.2.1.4. Détermination du degré de méthylation (DM) et d'acétylation (DA)	47
II.2.1.5. Dosage de l'acide férulique	48
II.2.1.6. Détermination de la masse moléculaire	49
II.2.2. Méthode pour la caractérisation des préparations enzymatiques.....	51
II.2.2.1. Dosage des protéines	51
II.2.2.2. Détermination des activités enzymatiques, des propriétés physico-chimiques et moléculaires des pectinases commerciales.....	51
II.2.2.2.1. Détermination du pH optimum et de la stabilité au pH de la Pectinase P-4716.....	51
II.2.2.2.2. Détermination de la température optimale et de la stabilité à la température de la Pectinase P-4716.....	52
II.2.2.2.3. Activité polygalacturonase (PG) contenue dans les différentes préparations commerciales	52
II.2.2.2.3.1. Dosage de l'activité exo-PG par la méthode au cyano-2-acétamide	52
II.2.2.2.3.2. Dosage de l'activité endo-PG par la mesure de la viscosité.....	53
II.2.2.2.4. Dosage de l'activité pectinéméthylestérase (PME) contenue dans la Rapidase Smart®.....	54
II.2.2.2.5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des préparations enzymatiques	55
II.2.3. Production d'oligosaccharides pectiques (POS) et méthodes de caractérisation	56
II.2.3.1. Production de POS par voie enzymatique	56
II.2.3.1.1. Hydrolyse de l'acide polygalacturonique	56
II.2.3.1.2. Hydrolyse de la pectine de betterave	56
II.2.3.2. Production de POS par voie thermique	57
II.2.3.2.1. Autohydrolyse de l'acide polygalacturonique.....	57
II.2.3.2.2. Production de POS par traitement thermique micro-ondes de solutions de pectine de betteraves	57
II.2.3.2.2.1. Facteur de sévérité	58
II.2.3.2.2.2. Plan expérimental	58
II.2.3.3. Méthodes d'analyse et de caractérisation des hydrolysats	61
II.2.3.3.1. Estimation de la masse moléculaire.....	61
II.2.3.3.2. Analyse de la composition en oligosaccharides des hydrolysats	61
II.2.3.3.3. Dosage du 5-hydroxyméthyl furfural (HMF) et du 2-furaldéhyde (2-F)	62
II.2.3.3.4. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier	62
II.2.3.3.5. Analyse calorimétrique différentielle	63
II.2.3.3.6. Diffraction des rayons X.....	64
II.2.3.3.7. Analyse au microscope optique	64
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	69
III.1. PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'OLIGOSACCHARIDES PECTIQUES PAR VOIE ENZYMATIQUE.....	69

<i>III.1.1. Production de POS à partir d'une pectine modèle (acide polygalacturonique) à l'aide de pectinases commerciales</i>	70
III.1.1.1. Comparaison des enzymes et contrôle des activités.....	70
III.1.1.1.1. pH optimum d'action et stabilité au pH de la Pectinase P-4716.....	70
III.1.1.1.2. Température optimale d'action et stabilité à la température de la Pectinase P-4716	71
III.1.1.1.3. Mesure des activités des pectinases commerciales utilisées	73
III.1.1.1.3.1. Activité exo-polygalacturonase (exo-PG).....	73
III.1.1.1.3.2. Activité endo-polygalacturonase (endo-PG).....	75
III.1.1.1.3.3. Bilan de l'ensemble des activités mesurées	76
III.1.1.1.4. Profil électrophorétique des différentes pectinases sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	76
III.1.1.2. Hydrolyse de l'acide polygalacturonique et caractérisation des produits d'hydrolyse.....	78
III.1.1.2.1. Analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec un détecteur ampérométrique	78
III.1.1.2.2. Quantification des oligogalacturonides	82
III.1.1.3. Conclusion.....	85
<i>III.1.2. Production de POS à partir de la pectine de betterave et caractérisation</i>	86
III.1.2.1. Mesure des activités et pureté de la Rapidase Smart®	86
III.1.2.2. Caractérisation chimique des échantillons de pectines	88
III.1.2.3. Hydrolyse de la pectine de betterave et caractérisation physico-chimique des produits d'hydrolyse.....	89
III.1.2.3.1. Analyse de la distribution de taille des hydrolysats	89
III.1.2.3.2. Analyse des hydrolysats produits par chromatographie d'échange d'anions	92
III.1.2.4. Caractérisation des propriétés physiques des poudres de POS obtenues	94
III.1.2.4.1. Analyses thermogravimétriques (ATG) et spectrométrie infrarouge.....	95
III.1.2.4.2. Analyses calorimétriques différentielles (ACD)	103
III.1.2.4.3. Analyses par diffraction des rayons X (DRX)	104
III.1.2.5. Conclusion.....	109
III.2. PRODUCTION DE POS PAR TRAITEMENT THERMIQUE (MICRO-ONDE) DE LA PECTINE DE BETTERAVE ET LEUR CARACTERISATION	110
<i>III.2.1. Influence des conditions du traitement sur la masse moléculaire des produits.</i>	111
<i>III.2.2. Effet des conditions du traitement sur la composition en oligosaccharides</i>	112
<i>III.2.3. Effet des conditions du traitement sur la production d'acide galacturonique et de POS</i>	116
III.2.3.1 Analyse statistique des réponses expérimentales : cas de l'acide galacturonique	119
III.2.3.1.1 Modèle de régression	119
III.2.3.1.2 Analyse des surfaces de réponses.....	122
III.2.3.2 Analyse statistique des réponses expérimentales : cas des POS	124
III.2.3.2.1 Modèle de régression	124
III.2.3.2.2 Analyse des surfaces de réponses.....	127
<i>III.2.4 Evolution de la concentration en 5-hydroxyméthyl furfural et en furaldéhyde au cours du traitement</i>	129
<i>III.2.5 Conclusion</i>	131
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les efforts de recherche et de développement de produits à haute valeur ajoutée et l'utilisation des agro-ressources riches en nutriments gagnent du terrain partout dans le monde. De grandes quantités de matériaux résiduels à faible valeur sont produites au cours des récoltes et de la transformation des aliments chaque année. Par exemples, les écorces d'agrumes représentent le principal sous-produit obtenu dans la fabrication industrielle de jus de fruits, les pelures de pomme de terre provenant de la production d'amidon, les pulpes de betterave provenant de l'extraction du saccharose et les résidus de marcs de pomme dans la production de cidre. La stratégie globale de l'utilisation de ces résidus végétaux, souvent considérés comme des déchets, réside dans le développement de produits dérivés fermentescibles et non-fermentescibles. Dans le cas des produits fermentescibles, les résidus sont utilisés comme des substrats microbiens pour le développement d'une variété de produits de haute valeur ajoutée. Dans les produits non-fermentescibles, les résidus agro-industriels sont traités pour l'extraction de molécules bioactives telles que les protéines, les antioxydants naturels et les vitamines (Bhushan *et al.*, 2008).

La caractéristique commune à ces sous-produits, est qu'ils sont essentiellement composés de fibres solubles ou insolubles comme la cellulose, la lignine, les hémicelluloses et les pectines (Elboutachfai *et al.*, 2008). Ces dernières fibres constituent une source de matières premières pour différentes branches industrielles (chimique, pharmaceutique, alimentaire et papetière). La valorisation alimentaire des produits et co-produits agricoles et agro-industriels est devenue une alternative incontournable pour la substitution de produits de synthèse (ester de sucres ...).

Les polysaccharides pectiques sont parmi les constituants principaux de la paroi cellulaire des plantes l'une des classes les plus complexes de polysaccharides. Ces substances ont fait l'objet de nombreuses recherches portant notamment sur leurs fonctions au sein de la paroi végétale, leur structure chimique et leur caractérisation en tant qu'additifs alimentaires (E440). Ces recherches ont conduit au développement de nombreuses applications des pectines dans des domaines aussi différents que l'industrie cosmétique, plastique et pharmaceutique, mais l'utilisation la plus importante se situe dans l'industrie alimentaire où les pectines sont essentiellement utilisées comme agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaississants (Thakur *et al.*, 1997 ; Mesbahi *et al.*, 2005). Les pectines ont également fait l'objet d'une attention particulière de la part des nutritionnistes. Elles sont en effet utilisées

comme des fibres alimentaires et exercent des effets physiologiques sur le tractus intestinal en réduisant le temps du transit et l'absorption du glucose (Olano-Martin *et al.*, 2002). Aujourd'hui, la consommation journalière de pectines dans un régime alimentaire occidental se situe entre 4 et 5 grammes. Quant à la consommation annuelle mondiale de pectine extraite industriellement, elle est estimée à 45 millions de kg (Willats *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, un domaine relativement nouveau de la recherche se concentre sur les propriétés fonctionnelles des oligosaccharides. En effet, les oligosaccharides sont des hydrates de carbone avec des degrés de polymérisation (DP) compris entre 2 et 20, mais des DP allant jusqu'à 30 sont souvent considérés comme des oligosaccharides (Barreteau *et al.*, 2006; Pinelo *et al.*, 2009 ; Delattre *et al.*, 2009). Les avancées de la recherche scientifique ont mis en lumière les différentes fonctions des oligosaccharides dans l'organisme et leur importance dans la promotion de la santé. L'intérêt majeur de ces nouveaux oligosaccharides réside dans leur diversité de structure qui offre un large spectre de propriétés et d'applications. L'utilisation des pectines dans le développement d'oligosaccharides à effet prébiotique (ingrédient fermenté sélectivement qui permet des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité de la microflore gastro-intestinale et qui a un effet bénéfique sur le bien-être et la santé de l'hôte) (Gibson *et al.*, 2004; Wang, 2009) et pharmaceutique constitue un nouveau domaine émergent. Pour cela, un grand intérêt est porté aux oligosaccharides pectiques (POS) en raison de leurs potentialités d'utilisation comme nouvelle génération de prébiotiques. Certaines des qualités attribuées à ces oligosaccharides sont la protection contre le cancer du colon, une action antibactérienne, la répression de l'accumulation de lipide dans le foie, l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et la stimulation de la croissance des bifidobactéries et d'*Eubacterium rectale* (Manderson *et al.*, 2005 ; Qiang *et al.*, 2009).

Le présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la mise au point d'un procédé de production et de caractérisation des oligosaccharides pectiques issus de matières premières renouvelables (co-produits tels que les pulpes de betterave) en vue de leur donner plus de valeur ajoutée dans des domaines d'applications aussi variés que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, la médecine etc.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les substances pectiques

I.1.1. Définition, description et classification des substances pectiques

Les substances pectiques sont des polymères complexes présents en abondance dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures. Les substances pectiques représentent environ 0,5 à 4% du poids frais du matériel végétal (Kashyap *et al.*, 2001). Elles sont composées de 17 monosaccharides différents avec plus de 20 types de liaisons (Ridley *et al.*, 2001 ; Vincken *et al.*, 2003). Les substances pectiques sont principalement composées d'une chaîne variable mais avec une large proportion d'acides galacturoniques partiellement méthyl-estérifiés, liés entre eux par des liaisons α -(1→4) (Blanco *et al.*, 1999), avec une masse moléculaire variant de 10 à 400 kDa suivant leur origine (Sakai *et al.*, 1993). D'après Kashyap *et al.* (2001), les substances pectiques peuvent être classées en 4 grands groupes : les protopectines, les acides pectiques, les acides pectiniques et les pectines.

Les protopectines sont les substances pectiques insolubles dans l'eau et présentes dans les parois cellulaires des plantes. Forme originelle des substances pectiques, les protopectines libèrent par hydrolyse acide restante, de la pectine et des acides pectiniques.

Les acides pectiques sont des acides polygalacturoniques non estérifiés. Ils ne sont pas solubles dans l'eau et n'ont pas d'aptitude à produire des gels en présence de sucre (60 à 65 %) et d'acide (pH 3) sans addition de cations bivalents. Les sels des acides pectiques sont appelés pectates.

Les acides pectiniques sont des acides polygalacturoniques qui contiennent une quantité non négligeable de groupes méthyl-esters. Ils sont solubles dans l'eau et ont la propriété de former des gels en présence de sucre, d'acide et si faiblement méthylés, en présence de sel de calcium. Les sels sont nommés pectinates.

Les pectines sont des hétéropolysaccharides constitués de plusieurs unités d'acides galacturoniques (GalA) en majorité sous forme d'esters méthyliques, et attachés l'un à l'autre par des liaisons osidiques α -(1→4). Les pectines englobent les acides pectiques, les acides pectiniques et leurs sels.

Les pectines présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques du fait de leur caractère polyélectrolytique. Ce caractère leur confère la capacité de s'associer entre elles et de former des gels en présence de cations divalents tel que le calcium (Fang *et al.*, 2008). Généralement,

les pectines sont caractérisées par leur degré de méthylation (DM) défini comme étant le pourcentage de groupements carboxyles estérifiés par le méthanol (Levigne *et al.*, 2002). Contrairement à l'acétylestérification, la méthylestérification est considérable dans les pectines natives (Pérez *et al.*, 2000 ; Tho *et al.*, 2006). Ainsi, en fonction du DM, on distingue:

- Les pectines HM (hautement méthylées) : ce sont les pectines dont le degré d'estérification est supérieur à 50%.

- Les pectines LM (faiblement méthylées) : ce sont les pectines dont le degré d'estérification est inférieur à 50%.

En revanche, Schmelter *et al.* (2002) parlent de LM lorsque le DM est compris entre 25 et 50% et de HM lorsque le DM est compris entre 50 et 80%.

Le DM est un paramètre important qui influe sur le processus et le mécanisme d'association des pectines dans la formation des gels. Les pectines HM forment des gels en présence de sucres neutres ou en milieu acide alors que les LM forment des gels en présence de calcium. Mis à part le DM, le pH, la concentration en sucre ou acide, la présence de chaînes latérales, le degré de polymérisation (DP) et la température jouent également un rôle important dans la formation d'un gel (Capel *et al.*, 2006; Guillotin *et al.*, 2007). Ces propriétés font que les pectines sont d'une importance considérable pour les industries alimentaire, pharmaceutique, biotechnologique et les industries de traitement de polluants (Willats *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2008).

I.1.2. Origine des substances pectiques

Les substances pectiques, ou plus simplement les pectines, sont exclusivement d'origine végétale et jouent un rôle important dans l'adhésion et le maintien des cellules des tissus végétaux (Iwasaki *et al.*, 1998). Elles forment un ciment rattachant les cellules les unes aux autres. Les pectines sont abondantes dans les fruits et les légumes (Tableau 1) et évoluent avec la maturation des tissus. Bien qu'elles puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux, les principales sources industrielles de pectines sont les marcs de pomme et les écorces de citron et d'orange.

Tableau 1: Teneurs en substances pectiques de quelques végétaux (Thakur *et al.*, 1997).

Fruits	Teneur en substances pectiques (% du poids frais)
Pomme (<i>Malus spp.</i>)	0,5-1,6
Marc de pomme	1,5-2,5
Banane (<i>Musa acuminata L.</i>)	0,7-1,2
Pulpe de betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Carambole (<i>Averrhoa carambola</i>)	0,66
Carotte (<i>Daucus carota</i>)	0,2-0,5
Goyave (<i>Psidium guajava L.</i>)	0,77-0,99
Pulpe de citron (<i>Citrus lemon</i>)	2,5-4,0
Litchi (<i>Litchi chinensis S.</i>)	0,42
Mangue (<i>Mangifera indica L.</i>)	0,26-0,42
Zeste d'orange (<i>Citrus sinensis</i>)	3,5-5,5
Papaye (<i>Carica papaya</i>)	0,66-1,0
Fruit de la passion (<i>Passiflora edulis S.</i>)	0,5
Péricarpe du fruit de la passion	2,1-3,0
Pêche (<i>Prunus persica</i>)	0,1-0,9
Ananas (<i>Ananas comosus L.</i>)	0,04-0,13
Fraise (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6-0,7
Tamarin (<i>Tamarindus indica L.</i>)	1,71
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	0,2-0,6

I.1.3. Structure moléculaire des pectines

Les pectines sont composées de différents polysaccharides associés : les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes, les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes. Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts à savoir, l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II (RG-I et RG-II) (Perrone *et al.*, 2002; Hilz *et al.*, 2006). En outre, d'autres galacturonanes substitués ont été décrits tels que les xylogalacturonanes et apiogalacturonanes.

I.1.3.1. Homogalacturonane

Les homogalacturonanes (Figure 1) sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturoniques reliés entre eux par des liaisons α -(1 \rightarrow 4). Ils représentent 57 à 69% de la pectine et forment la zone lisse de cette dernière (Jackson *et al.*, 2007 ; Mohnen, 2008). La région homogalacturonane peut contenir jusqu'à 72 voire 100 résidus d'acide galacturonique dans les pectines de citron, de betterave et de pomme (Thibault *et al.*, 1993). Les fonctions carboxyliques et alcools des résidus d'acide galacturonique peuvent être estérifiées respectivement par du méthanol en position C6 et par l'acide acétique en position C2 ou C3.

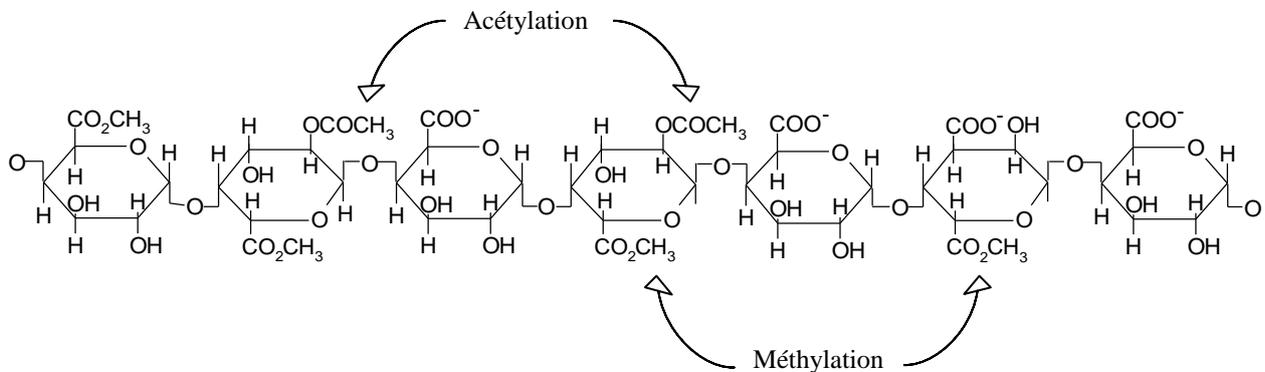


Figure 1: Structure primaire d'un homogalacturonane

La méthylestérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leur capacité d'interaction entre elles (Vincken *et al.*, 2003 ; Ralet *et al.*, 2005). Le degré de méthylation est non seulement important, mais la distribution des groupes méthyles sur la région homogalacturonane l'est aussi. En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre régions homogalacturonanes (Ridley *et al.*, 2001). Par exemple, des blocs de plus de dix résidus d'acide galacturonique non-estérifiés dans une pectine rendent celle-ci sensible aux liaisons interchaînes en présence du calcium (Vincken *et al.*, 2003).

I.1.3.2. Rhamnogalacturonane type I

Le RG-I est une famille de polysaccharides pectiques qui représente 7 à 14% de la pectine. Avec un DP d'environ 1000, le RG-I est constitué d'une alternance d'unités rhamnosiques et

d'unités galacturoniques [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow)]. Comme dans l'homogalacturonane, certains résidus d'acide galacturonique de RGI sont acétylés (Dumville *et al.*, 2000; Perrone *et al.*, 2002). Le degré de substitution des résidus de rhamnose varie généralement d'environ 20 à 80% selon l'origine du polysaccharide (Ridley *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2007), bien que des molécules de RG-I non ramifiées ont été rapportées dans la littérature (Vincken *et al.*, 2003). Différents substituants polysaccharidiques neutres peuvent se greffer sur le squelette osidique au niveau du carbone C4 du L-rhamnose (Figure 2). Parmi ces substituants, on peut citer des monosaccharides tels que L-arabinose ou D-galactose, et des polysaccharides tels que les arabinanes, les galactanes ou les arabinogalactanes de types I, composés décrits ci-dessous (Bonnin *et al.*, 2002a; Øbro *et al.*, 2004). Chez certains végétaux (betterave, épinard, etc...), les chaînes latérales peuvent également être substituées par des acides phénoliques (acide férulique ou coumarique) estérifiant les fonctions alcools en position C6 des résidus de galactose ou en position C2 des résidus d'arabinose (Bonnin *et al.*, 2002b).

Les arabinanes sont des chaînes de L-arabinofuranoses reliés entre eux par des liaisons α -(1 \rightarrow 5). Ils peuvent être substitués en O-2 et/ou O-3 par des monomères d' α -L-arabinofuranose et/ou des dimères d' α -L-arabinofuranose liés en (1 \rightarrow 3) (Ridley *et al.*, 2001; Vincken *et al.*, 2003).

Les galactanes se composent de chaînes de D-galactopyranoses reliés par des liaisons β -(1 \rightarrow 4). Les galactanes peuvent être ramifiés par des résidus arabinoses conduisant ainsi à des arabinogalactanes. Il existe deux types d'arabinogalactanes :

Les arabinogalactanes de type I ont un squelette constitué de D-galactopyranoses liés entre eux par des liaisons β -(1 \rightarrow 4), avec des résidus L-arabinofuranose attachés en position O-3 (Ridley *et al.*, 2001).

Les arabinogalactanes de type II sont plus répandus ; ils se composent de chaînes de D-galactopyranoses liés en β -(1 \rightarrow 3) avec des ramifications de L-arabinofuranoses en α -(1 \rightarrow 5). Ils peuvent aussi s'associer avec des protéines pour former un complexe arabinogalactane-protéines (AGPs) ou exister sous la forme d'un polysaccharide qui n'est lié à aucun autre constituant dans les exsudats de gomme (Hinz *et al.*, 2005). Des travaux ont rapporté que la pectine et l'arabinogalactane de type II sont souvent co-extraits ensemble et il est difficile de les séparer. De ce fait, on pense que la pectine et l'arabinogalactane de type II sont liés de manière covalente (Willats *et al.*, 2001 ; Vincken *et al.*, 2003).

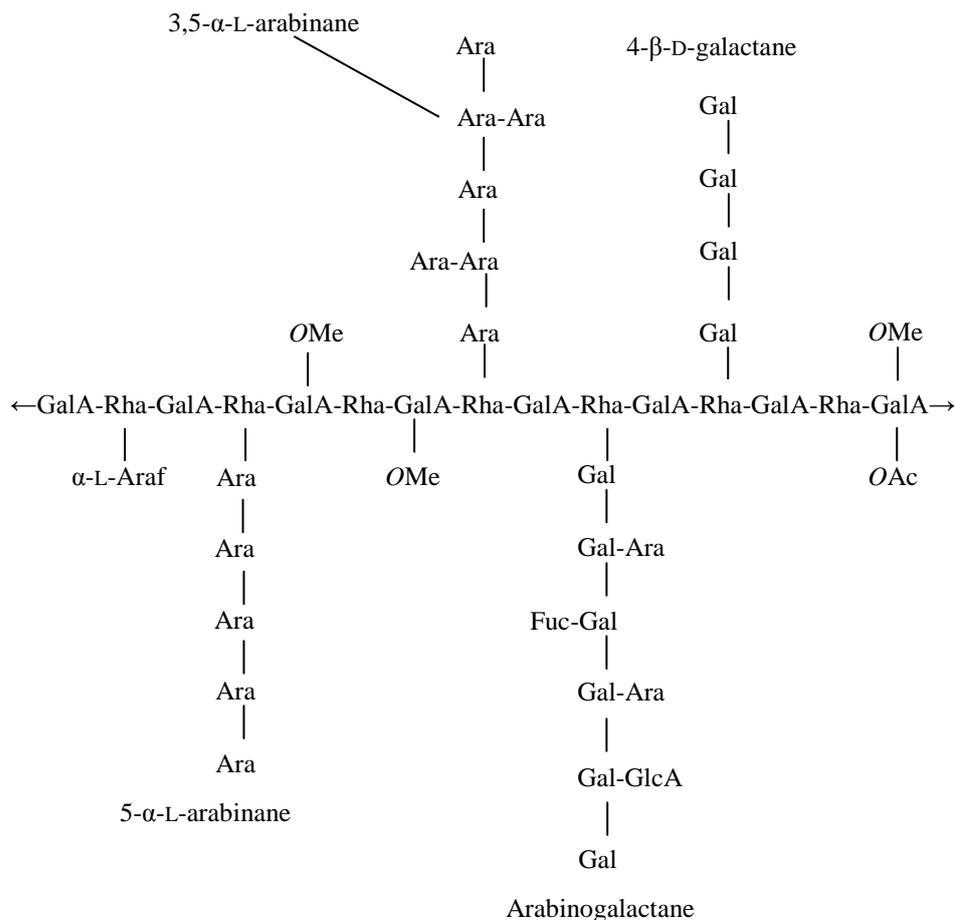


Figure 2: Structure d'un rhamnogalacturonane I avec Fuc: fucose; OMe: *O*-méthyl; OAc: *O*-acetyl.

I.1.3.3. Rhamnogalacturonane type II

Le RG-II est un galacturonane substitué de faible masse moléculaire qui représente 10 à 11% de la pectine et dont la structure complexe est très conservée au sein des espèces végétales (Strasser *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2007). Avec un DP d'environ 60 (Dumville *et al.*, 2000), le RG-II comprend au moins huit résidus d'acides galacturoniques liés en 1→4 constituant la chaîne principale, sur laquelle sont greffés quatre complexes glycosidiques différents A, B, C et D (Figure 3). Ces complexes glycosidiques sont composés d'arabinofuranose, d'arabinopyranose, de glucopyranose, de fucopyranose, d'apiofuranose, de galactopyranose (Strasser *et al.*, 2002) et d'autres sucres inhabituels tels que l'acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha), l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) et l'acide acérique. Il contient également des sucres méthylés rarement observés comme le 2-*O*-méthylxylose et le

2-*O*-méthylfucose (Doco *et al.*, 1997 ; Ridley *et al.*, 2001). Le RG-II se présente principalement sous la forme d'un dimère dans la paroi cellulaire des plantes par l'établissement de liaisons covalentes de diester de bore (Kobayashi *et al.*, 1996 ; Ishii *et al.*, 1996). Cette liaison est formée entre le *O*-2 et le *O*-3 des résidus β -D-apiofuranose de chaque sous-unité monomérique de RG-II. En outre, il a été montré que seul le résidu apiofuranose de chaque chaîne latérale A participe à cette dimérisation (Ishii *et al.*, 1999; Ridley *et al.*, 2001).

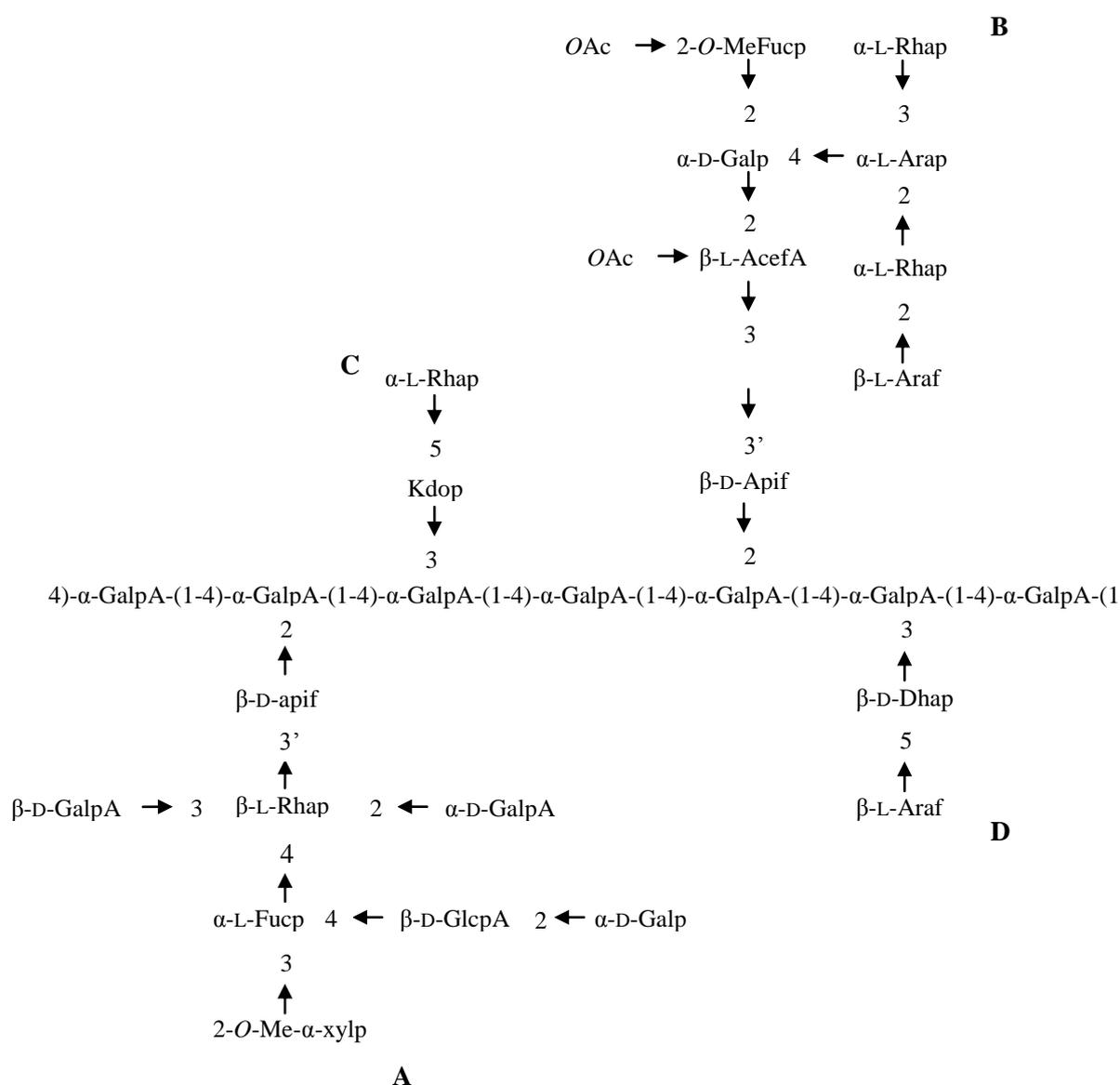


Figure 3: Structure primaire du rhamnogalacturonane II avec quatre chaînes latérales de structure différente (A-D) (Ridley *et al.*, 2001).

I.1.4. Propriétés des substances pectiques

Du fait de leur hétérogénéité de composition chimique, les substances pectiques possèdent des propriétés technofonctionnelles qui dépendent des conditions d'emploi et du processus dans lequel interviennent ces polysaccharides. L'estérification ou non par du méthanol au niveau de la fonction acide des unités galacturoniques joue également un rôle important sur les propriétés physico-chimiques des pectines, notamment sur la formation des gels (Sila *et al.*, 2009).

I.1.4.1. Solubilité des pectines

Généralement les pectines sont solubles dans l'eau et insolubles dans la plupart des solvants organiques tels que l'alcool, l'acétone etc. A température ambiante et à leur propre pH (2,8-3,2), les pectines sont d'autant plus solubles dans l'eau que leur degré d'estérification est plus élevé. Les solvants organiques précipitent les pectines ; les cations polyvalents (Al, Cu, Ca...) font de même en formant des pectinates insolubles d'autant plus facilement que la pectine est moins estérifiée. Ainsi les pectinates de sodium sont plus solubles que les acides pectiniques, qui sont plus solubles que les pectinates de calcium. Cependant les pectines sont souvent solubles dans le DMSO, le formamide, le diméthylformamide et le glycérol (Voragen *et al.*, 1995).

I.1.4.2. Stabilité des pectines

Les solutions aqueuses de pectine sont stables à pH 3 et 4 à une température ambiante de 20°C (Voragen *et al.*, 1995). En milieu acide, les liaisons glycosidiques et les liaisons esters sont hydrolysées même sous 10°C. Ces réactions sont accélérées quand la température augmente. En milieu neutre et basique, la saponification est accompagnée de la réaction de β -élimination. Ces réactions sont accélérées par l'augmentation de la température. A basse température (en dessous de 10°C), les désestérifications dominent et il n'y a pas de β -élimination (Renard, 1989). La stabilité thermique des pectines est illustrée par la figure 4.

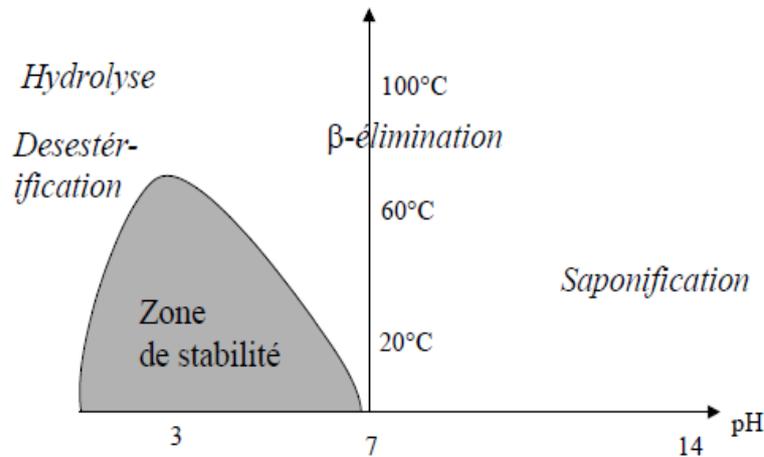


Figure 4: Stabilité thermique des pectines en milieu aqueux (selon Renard, 1989)

I.1.4.3. Viscosité des pectines

Les solutions de pectines ont des viscosités inférieures à la plupart des autres gommes, ce qui limite leur application dans l'augmentation de la viscosité d'un produit. Toutefois les solutions de pectines possèdent un comportement newtonien à faible concentration. A forte concentration; elles deviennent pseudoplastiques (Srivastava et Malviya, 2011). La viscosité des pectines dépend :

- de la concentration et de la température,
- du poids moléculaire et du degré d'estérification de la pectine,
- de la présence d'électrolyte dans le milieu.

I.1.4.4. Gélification des pectines

Les pectines constituent l'un des principaux agents gélifiants utilisés dans l'industrie agro-alimentaire. Pour former un gel, il faut que les molécules de pectines puissent s'associer et créer des ponts entre elles (Leroux *et al.*, 1983). Les propriétés gélifiantes des pectines sont fortement influencées par le degré de méthylation, la concentration en calcium, le pH, la teneur en sucre (saccharose) et la température. Ainsi, les pectines hautement méthylées (HM) dont le degré de méthylation est supérieur à 50% forment généralement des gels non

thermoréversibles à pH acide (3) en présence de teneurs élevées en saccharose (60%) qui diminue l'activité de l'eau. L'acidification à chaud d'un milieu sucré et pectiné provoque sa gélification. Aussi aux faibles valeurs de pH (3), les répulsions électrostatiques sont minimisées à cause du nombre élevé des groupements carboxyliques non ionisés qui eux augmentent l'attraction entre les groupes méthoxyles, hydroxyles et carboxyles entraînant ainsi la gélification. De même les liaisons hydrogènes entre les chaînes d'acides galacturonique et les interactions hydrophobes entre les groupes esters des pectines participent à l'agrégation des molécules et à la stabilité de leur structure. La rigidité du gel augmente cependant avec la diminution du pH et avec l'augmentation de la concentration de pectine (Sharma *et al.*, 1998).

Contrairement aux HM, la formation de gel par les pectines LM requiert la présence de cations divalents. Les gels formés par les LM sont thermoréversibles et ont souvent des textures plus faibles que celles des gels de pectine HM. En plus du DM, la formation de gel est aussi influencée par la masse moléculaire des polymères : plus elle est élevée, plus le pouvoir gélifiant des pectines est important (Guillotin *et al.*, 2007).

I.1.5. Intérêt des pectines

Les pectines sont des constituants naturellement présents dans les aliments de l'homme. Les pectines extraites et purifiées sont utilisées dans un grand nombre de domaines, mais principalement par l'industrie alimentaire. Leur utilisation en tant qu'hydrocolloïde alimentaire est principalement basée sur leurs propriétés de gélification. Les pectines sont employées dans diverses préparations, essentiellement en tant qu'additifs alimentaires (E440), agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaississants (Voragen *et al.*, 1995; Laurent et Boulenguer, 2003). Elles sont de plus utilisées comme des substituts de matière grasse ou de sucre dans les aliments faiblement caloriques (Thakur *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il a été rapporté que les pectines possèdent des effets biologiques bénéfiques. Elles sont utilisées comme des fibres alimentaires qui possèdent des propriétés anti-cholestérol, anti-diarrhéiques et anti-carcinogènes. Elles sont aussi utilisées pour la désintoxication comme régulateurs et protecteurs gastro-intestinaux (Matsumoto *et al.*, 2008 ; Martínez *et al.*, 2010).

Les pectines présentent, en outre, des intérêts pour l'industrie cosmétique où elles servent à la préparation de baumes, crèmes, savons, shampooings, et pâtes (Thakur *et al.*, 1997).

I.2. Production des oligosaccharides pectiques

Les POS sont des fragments pectiques de compositions complexes dérivés de la pectine. Plusieurs modes de production des POS sont envisageables. Il peut s'agir de traitements chimiques utilisant des acides dilués ou concentrés (acides chlorhydrique, sulfurique, trifluoroacétique, formique ou nitrique) chauffés entre 50 et 90°C (Courtois, 2009). Certains traitements physiques peuvent également être utilisés: chauffage, micro-ondes, irradiation γ et ultrasonication (Barreteau *et al.*, 2006; Courtois, 2009 ; Gullón *et al.*, 2013). Par exemple le traitement de polysaccharides par chauffage micro-ondes pour obtenir des oligosaccharides, entraîne par rapport au chauffage classique, une diminution des temps de réactions, de bons rendements et une diminution des réactions secondaires (Courtois, 2009). L'irradiation γ induit principalement la formation de radicaux hydroxyles libres qui catalysent la dépolymérisation du polysaccharide (Courtois, 2009). Cependant, lorsque le processus de dégradation est associé à une température de plus de 100°C, des quantités résiduelles de protéines ou de peptides présents dans l'échantillon peuvent provoquer des réactions de Maillard, par conséquent des molécules indésirables et potentiellement toxiques peuvent se former (Courtois, 2009). Enfin les traitements enzymatiques permettent, contrairement aux deux types de méthodes précédentes, des coupures plus spécifiques des chaînes pectiques. L'utilisation d'enzymes permet de cibler le site de réaction et d'opérer dans des conditions douces qui limitent les réactions secondaires (comme la caramélisation). Ces enzymes appartiennent au groupe des hydrolases ou lyases et sont spécifiques des liaisons glycosidiques; toutefois, la présence de substituants sur les unités osidiques peut inhiber le clivage du polymère. Les enzymes impliquées dans la dégradation des pectines sont nombreuses du fait de la nature complexe du polysaccharide.

I.2.1. Les enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les microorganismes. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (Figure 5) et, les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques. La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine

fongique, *Aspergillus niger* étant la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle de ces enzymes (Jayani *et al.*, 2005).

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres *et al.*, 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes: les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérases (polygalacturonases et lyases).

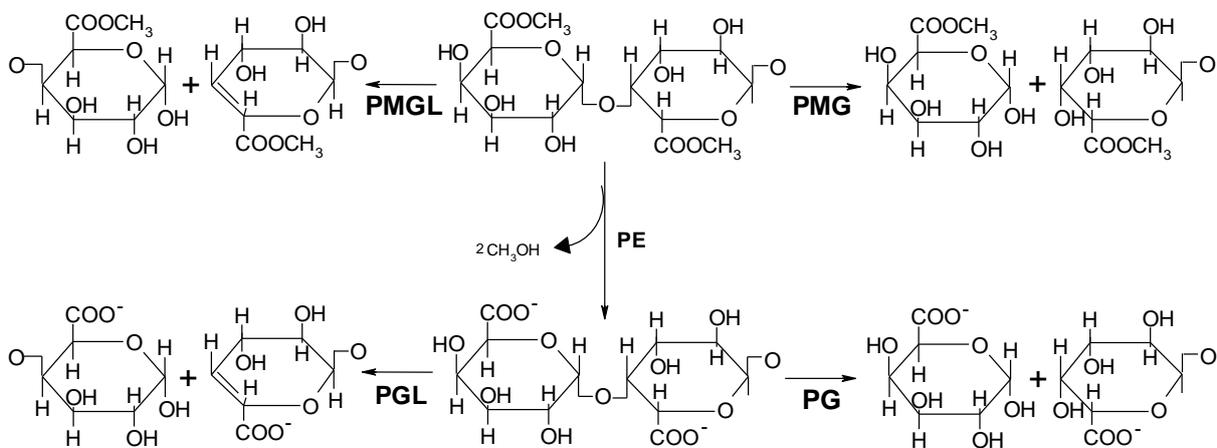


Figure 5: Mode d'action des pectinases (PMGL: polyméthylgalacturonate lyase; PMG: polyméthylgalacturonase; PE: pectinestérase; PGL: polygalacturonate lyase; PG: polygalacturonase).

1.2.1.1. Pectinestérases (PE) ou pectineméthylestérases (PME)

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines HM, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. L'activité de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un titrateur automatique de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani *et al.*, 2005). Les PE sont présentes dans de nombreux végétaux supérieurs et elles peuvent être extraites de divers fruits tels que la banane, l'orange, la tomate, la papaye et la pomme (Denès *et al.*, 2000). Mais elles peuvent être aussi produites par des champignons, des bactéries et des levures. Les PE des végétaux, très spécifiques des

esters méthyliques des acides pectiques, sont mieux connues que celles d'origines fongique et bactérienne. Leur pH optimum est compris entre 7 et 8, alors que les PE fongiques et bactériennes sont plus actives à pH 4-5. Les PE hydrolysent seulement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre et retirent ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée (Sakai *et al.*, 1993). Beaucoup de travaux ont été menés sur les propriétés physico-chimiques et cinétiques des PE, cependant leur mode d'action n'est pas totalement élucidé. Selon Jayani *et al.* (2005), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de l'origine. Ainsi, les PE fongiques agissent au hasard suivant un mécanisme «multi-chaîne» par lequel l'enzyme forme un complexe enzyme-substrat, se dissocie après la réaction et s'associe à nouveau avec une autre molécule du substrat pour hydrolyser les groupes méthyles. En revanche, les PE des végétaux tendent à agir à l'extrémité non réductrice ou à côté d'un groupe carboxyle libre le long de la molécule par un mécanisme «unichaîne» où le substrat est progressivement déméthylé jusqu'à ce que l'enzyme atteigne l'extrémité de la chaîne ou un résidu qui bloque sa progression pour se dissocier du complexe enzyme-substrat (Cameron *et al.*, 2008). Un troisième mode d'action a été évoqué : il s'agit d'un mécanisme d'attaque multiple qui est un mécanisme intermédiaire aux deux premiers. Dans ce cas, l'enzyme catalyse la transformation d'un nombre moyen de résidus pour chaque complexe enzyme-substrat formé (Denès *et al.*, 2000; Cameron *et al.*, 2008). La PE est inhibée par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations (Ca^{2+} , Na^+) pourrait contrecarrer l'inhibition. Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (Sakai *et al.*, 1993).

I.2.1.2. Dépolymérasés

Les dépolymérasés sont des hydrolases (polygalacturonases et lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. Les dépolymérasés peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes: les polygalacturonases (PG), les polyméthylgalacturonases (PMG), les polygalacturonate lyases (PGL) et les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL). Les PG et PMG agissent respectivement sur les pectates et les pectines par un mécanisme d'hydrolyse tandis que les PGL et PMGL agissent respectivement par β -élimination sur les pectates et les

pectines (Alkorta *et al.*, 1997). Suivant leur mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de manière aléatoire au sein de la chaîne, soit à son extrémité, ce qui permet de distinguer respectivement les endo- et les exo-dépolymérase (Jayani *et al.*, 2005).

I.2.1.2 1. Les polygalacturonases (PG)

Les PG sont des enzymes pectolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1→4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non/ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont soit des endo-PG (EC 3.2.1.15) soit des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani *et al.*, 2005). Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG. L'activité est appréciée en mesurant la diminution de viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine). La comparaison des mesures de viscosité et de pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la part des activités « endo » et « exo ». Ainsi, avec une endo-PG, la viscosité diminue de moitié quand seulement 2 à 3% des liaisons glycosidiques sont rompues. Avec une exo-PG, le même abaissement de la viscosité n'est observé qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques (Sakai *et al.*, 1993 ; Jayani *et al.*, 2005). Les endo-PG sont produites par divers microorganismes tels que des bactéries, des levures et des moisissures. Elles sont aussi présentes chez certains végétaux et surtout dans les fruits. En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di-, et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono, di, et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines HM, l'hydrolyse n'a lieu qu'au niveau des résidus d'acides galacturoniques non méthylés. Toutefois, lorsque le DM augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai *et al.*, 1993). Les exo-PG sont moins fréquentes. Elles sont produites par des moisissures et quelques bactéries. On distingue deux types : les exo-PG fongiques libérant comme produit final l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique.

Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action (Tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés biochimiques et physico-chimiques de quelques polygalacturonases (Jayani *et al.*, 2005 ; De Vries et Visser, 2001).

Sources PG	Nature	Masse	pI	Activité		
		moléculaire (Kda)		spécifique (U/mg)	T _{op} (°C)	pH _{op}
Aspergillus japonicus	EndoPG I	38	5,6	-	30	4,0-5,5
	EndoPG II	65	3,3	-	30	4,0-5,5
<i>Aspergillus oryzae</i>	EndoPGA	41	-	-	45	5,0
<i>Thermococcus aurantiacus</i>	Endo	35	5,9	5890	55	5,0
<i>Aspergillus niger</i>	EndoPG I	61	-	982	43	3,8-4,3
	EndoPG II	38	-	3750	45	3,0-4,6
<i>Bacillus sp</i> KSM-P410	Exo	45	5,8	54	60	7,0
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo	63	-	2571	50	5,0
<i>Aspergillus awamori</i>	Endo	41	6,1	487	40	5,0
<i>Aspergillus alliaceus</i>	ExoPG1	40	5,7	-	45-50	3,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	Exo	38	-	209	69	11,0
<i>Aspergillus alliaceus</i>	EndoPG	40	5,9	-	35	5,5
<i>Sclerotinia borealis</i>	Endo	40	7,5	2088	40-50	5,0
<i>Aspergillus niger</i>	ExoPG I	66	5,6	-	60	3,8
	ExoPG II	63	5,8	209	60	4,5
<i>Fusarium oxysporum f sp</i>	Exo	-	-	209	69	11,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo	39	-	2870	45	5,5

pI : Point isoélectrique

Top : Température optimale

pHop : pH optimum

I.2.1.2 2. Les lyases ou transéliminases

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de β -élimination. Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés (Yadav *et al.*, 2009). De plus les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Les lyases sont classées en différents types sur base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent (Tableau 3).

Tableau 3: Classification des lyases (Jayani *et al.*, 2005).

Enzyme	Numéro EC	Mécanisme d'action	Modèle d'action	Premier substrat	Produits
Endopolygalacturonase lyase	4.2.2.2	Trans - élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés
Exopolygalacturonase lyase	4.2.2.9	Trans- élimination	Avant dernière liaison	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
Endopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase	4.2.2.10	Trans- élimination	Aléatoire	Polyméthyl-D-digalacturonates insaturés	Méthyloligo-galacturonates insaturés
Exopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase		Trans- élimination	Dernière liaison	Polyméthyl-D-digalacturonates insaturés	Méthylmono-galacturonates insaturés

Comme pour les PG, selon que la réaction enzymatique se fait au hasard ou à l'extrémité de la chaîne, on distingue les endo et les exo-lyases. Les réactions catalysées par les lyases sont illustrées à la Figure 5.

Les PGL sont produites par plusieurs bactéries et quelques moisissures pathogènes, avec les endo-PGL plus abondantes que les exo-PGL. Les PMGL sont produites par *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli* et *Pichia pinus*. La plupart des lyases sont d'origine microbienne. Les lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectinolytiques. Les PGL sont activées par les ions Ca^{2+} et, dans certains cas par d'autres ions divalents tels que Mg^{2+} , Co^{2+} et Sr^{2+} . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA. Les PMGL sont quant à elles actives en absence d'ions Ca^{2+} mais la présence de Ca^{2+} ou d'autres cations les stimule. Les PMGL sont les seules dépolymérase capables de dégrader les pectines HM sans action préalable d'autres enzymes (Jayani *et al.*, 2005).

I.2.2. Autres enzymes intervenant dans la dégradation des substances pectiques

L'amélioration des connaissances sur les différences structurales entre la chaîne principale des régions linéaires et ramifiées de la pectine a permis de découvrir de nouvelles enzymes impliquées dans la dégradation des chaînes latérales des substances pectiques (De Vries et Visser, 2001). Ces enzymes purifiées ont également acquis une importance en tant qu'outils

analytiques dans les études structurales en raison de leur grande spécificité. Une série d'enzymes, toutes hautement spécifiques pour la région ramifiée de la pectine, a été purifiée et caractérisée. Parmi ces enzymes, il y a lieu de citer les rhamnogalacturonases, les arabinanases et les galactanases (Mutter *et al.*, 1998).

I.2.2.1. Rhamnogalacturonases

La rhamnogalacturonase isolée à partir d'*Aspergillus aculeatus* est spécifique du squelette rhamnogalacturonique au niveau des zones ramifiées où il existe une alternance d'unités rhamnose et galacturoniques. Deux endo-rhamnogalacturonases (RhgA, RGase A) et deux exo-rhamnogalacturonases (RG-rhamnohydrolase, RG-galacturonohydrolase) ont été isolées chez cette moisissure. Ces enzymes sont freinées dans leur action par la présence de groupements acétyles (De Vries et Visser, 2001).

Les produits libérés par cette enzyme sont des oligomères linéaires composés d'une alternance de rhamnose et d'acide galacturonique (4 à 6 résidus) avec des résidus galactoses connectés à certains ou à tous les résidus rhamnose (Schols *et al.*, 1995 ; Ros *et al.*, 1996).

I.2.2.2. Arabinanases

Les arabinanases sont des enzymes capables d'hydrolyser les arabinanes, mais aussi les chaînes latérales d'arabinose présentes dans les arabinoxylanes et les arabinogalactanes.

Dans la nature, différents microorganismes secrètent des endo-arabinanases (EC 3.2.1.99) et des arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) pour la dégradation des polysaccharides contenant de l'arabinose. Cependant, la plupart des préparations enzymatiques commerciales contenant des activités arabinanases sont obtenues à partir de moisissures comme par exemple *Aspergillus niger*. Cette moisissure secrète deux arabinofuranosidases (AbfA et AbfB) et une endo-arabinanase. L'arabinofuranosidase de type A agit seulement sur les petites chaînes de résidus arabinose liés par des liaisons α -(1→5) tandis que le type B hydrolyse les liaisons α -(1→5), α -(1→3) et α -(1→2) des résidus arabinoses. A la différence de certaines arabinofuranosidases, l'arabinofuranohydrolase d'*Aspergillus awamori* est incapable de libérer l'arabinose de la pectine mais est fortement spécifique des résidus d'arabinose liés au xylane (Gielkens *et al.*, 1999). L'endo-arabinanase agit au hasard sur les liaisons α -(1→5) des polysaccharides d'arabinane qui sont présents dans les chaînes latérales de la pectine. Cette

enzyme augmente fortement l'efficacité de la dégradation des arabinanes et influence l'action des arabinofuranosidases. Jusqu'ici, seulement une exo-arabinanase d'*Aspergillus* a été purifiée. Cette enzyme libère principalement de l'arabinobiose et peu d'arabinotriose (De Vries et Visser, 2001).

I.2.2.3. Galactanases

Les galactanases sont impliquées dans la dégradation des polysaccharides des plantes en général et des pectines en particulier. Deux types de chaînes arabinogalactanes sont présents dans la pectine. Le type I se compose d'unités galactose liées par des liaisons β -(1→4) alors que le type II contient des résidus galactose liés par des liaisons β -(1→3) qui peuvent être substitués avec des résidus galactose en β -(1→6). De plus, les deux types d'arabinogalactanes peuvent être substitués avec une chaîne d'arabinofuranose en α -(1→3). Parallèlement aux deux types d'arabinogalactanes, il existe deux types de galactanases: les endo- β -1,4-galactanases et les exo- β -1,3-galactanases. La différence entre ces enzymes réside dans leur capacité à hydrolyser les liaisons β -(1→3), β -(1→4) ou β -(1→6) entre les résidus de galactose. Les endo- β -1,4-galactanases sont actives sur les galactanes et les arabinogalactanes de type I, libérant ainsi des galacto-oligosaccharides. Les endo- β -1,4-galactanases bactériennes libèrent principalement du galactotriose et du galactotétraose bien que certaines libèrent aussi du galactobiose (De Vries *et al.*, 2002). Les exo- β -1,3-galactanases sont actives sur les arabinogalactanes de type II où elles hydrolysent spécifiquement les liaisons β -(1→3) (De Vries et Visser, 2001).

I.2.3. Production à l'échelle industrielle d'enzymes pectinolytiques

Aujourd'hui, plusieurs firmes sont spécialisées dans la production d'enzymes pectinolytiques. Les principaux producteurs sont Novozymes (Pays-Bas), Novartis (Suisse), Roche (Allemagne), et Biocon (Inde) (Tavčer, 2011). Outre les enzymes pectinolytiques citées, d'autres existent sous des noms différents et il convient de souligner qu'elles sont toutes déjà commercialisées. Le tableau 4 présente quelques unes de ces firmes et les différentes enzymes pectinolytiques qu'elles produisent.

Tableau 4: Quelques firmes productrices d'enzymes pectolytiques.

Enzymes	Firmes					
	Megazyme	Novozymes	Biocatalysts	DSM	Cognis	Genencor International
Pectinase 62L			+			
Endo- Polygalacturonase M2	+					
Pectinex Smash XXL		+				
Pectinex Ultra SP-L		+				
Rhamnogalacturonane hydrolase	+					
Rapidase Smart®				+		
Forylase					+	
Viscozyme		+				
Arabinanase	+					
Galactanase	+					
Bioprep 3000L		+				
Pectate lyase	+					
Rapidase®				+		
Pulpzyme HC		+				
Scourzyme L		+				
Novoshape		+				
Macer8 FJ			+			
Multifect pectinase PL						+
Rhamnogalacturonane lyase	+					

I.2.4. Utilisations des enzymes pectinolytiques

Les premières utilisations des enzymes pectolytiques ont été observées dans les années 30 dans des vins et des jus de fruits, pour faciliter l'extraction, la filtration, la clarification et la stabilité (Sakai *et al.*, 1993). C'est seulement en 1960, avec la connaissance de la nature chimique des tissus de plantes, que l'utilisation de ces enzymes va s'élargir (Kashyap *et al.*, 2001). Leur activité, leur spécificité d'action ainsi que les conditions réactionnelles en font d'excellents outils de catalyse. Les enzymes pectinolytiques permettent notamment de

remplacer les produits chimiques du fait de leur disponibilité, de leur biodégradabilité et de leur toxicité moindre (Jayani *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, ces enzymes sont de plus en plus utilisées dans divers secteurs industriels tels que :

- Industrie des jus de fruits et du vin :

Les enzymes pectinolytiques permettent d'augmenter la capacité d'extraction du jus dans la fabrication des jus de fruits et d'augmenter l'arôme des vins en œnologie. En outre, elles sont utilisées dans la macération, la clarification et la stabilisation des jus de fruits et du vin. Elles diminuent la viscosité et augmentent le rendement en jus et en vin grâce à la dégradation des substances pectiques (Chaudhri et Suneetha, 2012 ; Raghuwanshi *et al.*, 2013).

- Alimentation animale :

L'utilisation des enzymes dans l'alimentation de bétails et de volailles a commencé au début des années 1980. Le premier succès commercial fut celui de l'ajout de la β -glucanase dans des régimes alimentaires à base d'orge. Habituellement, les préparations enzymatiques pour l'alimentation animale sont des cocktails enzymatiques contenant des glutanases, xylanases, protéases, amylases et pectinases. L'ajout de pectinases réduit la viscosité et augmente l'absorption des nutriments (Raghuwanshi *et al.*, 2013).

- Fermentation de café et du thé :

Les enzymes pectolytiques sont utilisées pour enlever la couche mucilagineuse des grains de café en grande partie constituée de substances pectiques. Elles accélèrent la fermentation du thé et détruisent la propriété de formation de mousse des poudres de thé instantané par dégradation des substances pectiques (Raghuwanshi *et al.*, 2013).

- Industrie papetière :

Les enzymes pectinolytiques sont utilisées dans les procédés de fabrication du papier pour faciliter le travail des agents de blanchiment et de rétention et ainsi améliorer la qualité du papier et contribuer à la dépollution des effluents (Raghuwanshi *et al.*, 2013).

- Industrie textile :

Les enzymes pectinolytiques sont utilisées pour le prétraitement (débouillissage) des fibres de coton et le rouissage et l'adoucissage des fibres de plantes fibreuses libériennes telles que la ramie, le lin, le chanvre et le jute pour obtenir des fibres textiles de très bonne qualité (Ahlawat *et al.*, 2009 ; Yuan *et al.*, 2011).

- Industrie huilière :

Les enzymes pectinolytiques sont utilisées pour extraire l'huile végétale par un processus de liquéfaction des composants de la paroi cellulaire contenant l'huile comme dans l'extraction

de l'huile d'olive et des zestes d'agrumes. Dans le cas des agrumes, ces enzymes détruisent les propriétés émulsifiantes de la pectine facilitant ainsi la collecte de l'huile. Dans le cas des olives, les enzymes sont ajoutées au cours du processus de broyage des olives pour faciliter la libération de l'huile. Olivex est une préparation enzymatique issue d'une souche d'*Aspergillus aculeatus* qui contient, en plus des activités hémicellulases et cellulases, des activités pectinolytiques. Elle permet une augmentation du rendement d'extraction et une meilleure stabilité de l'huile contre le rancissement lors du stockage (Chiacchierini *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Najafian *et al.*, 2009 ; Sowbhagya *et al.*, 2011).

- Traitement des eaux usées :

L'emploi des enzymes pectinolytiques dans le traitement des eaux usées provenant de l'industrie de transformation des agrumes est une alternative plus rentable et respectueuse de l'environnement par rapport aux techniques existantes notamment la déshydratation physique, la coagulation chimique, le traitement de boues activées et l'hydrolyse chimique qui conduisent à la formation du méthane. Ceux-ci présentent l'inconvénient d'avoir un coût élevé de traitement, un temps de traitement plus long en plus de la pollution de l'environnement par l'utilisation de produits chimiques. Par exemple, les pectinases provenant des bactéries éliminent sélectivement les substances pectiques des eaux usées, les rendant ainsi plus aptes au traitement de boues activées (Arunachalam et Asha, 2010 ; Raghuwanshi *et al.*, 2013).

Depuis quelques années, la technologie micro-onde a été appliquée pour la synthèse des produits à valeur ajoutée dans bon nombre d'études. Dans le contexte de production d'oligosaccharides issus de matières premières renouvelables, l'utilisation des micro-ondes apparaît comme une nouvelle approche.

I.2.5. Le réacteur micro-ondes

Parmi les méthodes de dépolymérisation des polysaccharides, les hydrolyses enzymatiques et chimiques ont été les plus utilisées. Cependant d'autres méthodes alternatives sont également applicables, par exemple le traitement thermique via le réacteur micro-ondes. Le chauffage par le réacteur micro-ondes est une méthode de plus en plus populaire de chauffage qui remplace le chauffage classique parce qu'elle s'avère être une méthode propre, pas chère et

pratique. Souvent, elle offre des rendements plus élevés et des temps de réaction plus courts. Ce mode de chauffage a été étendu à presque tous les domaines de la chimie avec l'exception de la chimie des glucides qui a subi un certain retard, comme en témoigne le nombre limité d'applications. Un inconvénient majeur de cette technologie cependant, est le fait que la synthèse micro-onde n'est pas facilement transposable de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle.

I.2.5.1. Définition

Les micro-ondes sont une forme d'énergie électromagnétique non ionisante qui s'étend sur une gamme de fréquences allant de 300 MHz à 300 GHz. Les longueurs d'ondes associées sont comprises entre 1 millimètre et 1 mètre (Mandal *et al.*, 2007, kappe, 2004). Elles sont donc du même ordre de grandeur que les dimensions des produits à traiter.

Dans le spectre électromagnétique, les micro-ondes se situent entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion (Figure 6). Toutefois, des règles d'utilisation limitent l'emploi des micro-ondes à certaines fréquences. La fréquence de 0,896 GHz est appliquée en Europe tandis que celle de 0,915 GHz est appliquée aux Etats-Unis. Par ailleurs, les fréquences de 0,915 GHz et 2,45 GHz sont couramment utilisées parce qu'elles correspondent aux bandes de fréquences qui peuvent être utilisées pour des applications industrielles, scientifiques, médicales et domestiques (connue sous le nom de bande ISM) et parce que la profondeur de pénétration du micro-ondes est plus grande pour ces fréquences (Das *et al.*, 2009 ; Pereira et Vicente, 2010). La fréquence de 2,45 GHz est surtout utilisée dans les micro-ondes domestique et de laboratoire tandis que celle de 0,915 GHz est préférable dans les micro-ondes industriels commerciaux, afin d'éviter les interférences avec les appareils de télécommunication et les radars (kappe, 2004, Roy et Gupta, 2003 ; Das *et al.*, 2009).

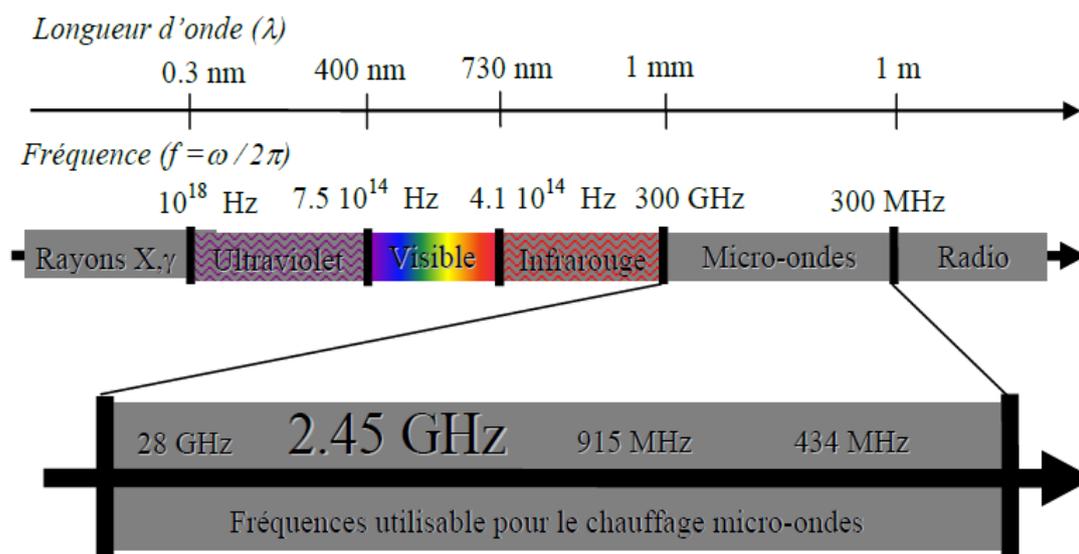


Figure 6: Spectre électromagnétique

I.2.5.2. Description et fonctionnement du réacteur micro-ondes

Le réacteur micro-ondes est constitué de trois principaux éléments à savoir: le magnétron, le guide d'onde et l'applicateur ou cavité.

Le magnétron constitue le cœur du réacteur micro-ondes. C'est lui qui est à la base de la production de l'onde électromagnétique. Le magnétron est principalement composé d'un tube anodique qui contient en son centre une cathode reliée à un générateur externe. La cathode émet des électrons dans la cavité résonnante du tube, ces derniers sont attirés par l'anode puis déviés par une force magnétique créée par un aimant situé à l'extérieur de l'enceinte pour éviter que les électrons ne se fixent aux parois. Les électrons parcourent donc un chemin en spirale en passant dans plusieurs cavités creusées dans l'anode. Cette oscillation crée les ondes électromagnétiques.

Le guide d'ondes est une pièce métallique conducteur qui permet de propager les ondes émises par le magnétron vers l'enceinte d'application.

Enfin, l'applicateur ou cavité qui est une enceinte fermée dans laquelle est placé le produit à traiter. Il assure le transfert de l'onde électromagnétique véhiculée par le guide d'ondes vers le produit à traiter (Mandal *et al.*, 2007). Les réacteurs micro-ondes actuels sont classés en deux catégories suivant le mode de propagation de l'onde dans l'applicateur. On parle ainsi de cavité monomode ou multimode (Figure 7a et 7b) (Letellier et Budzinski, 1999).

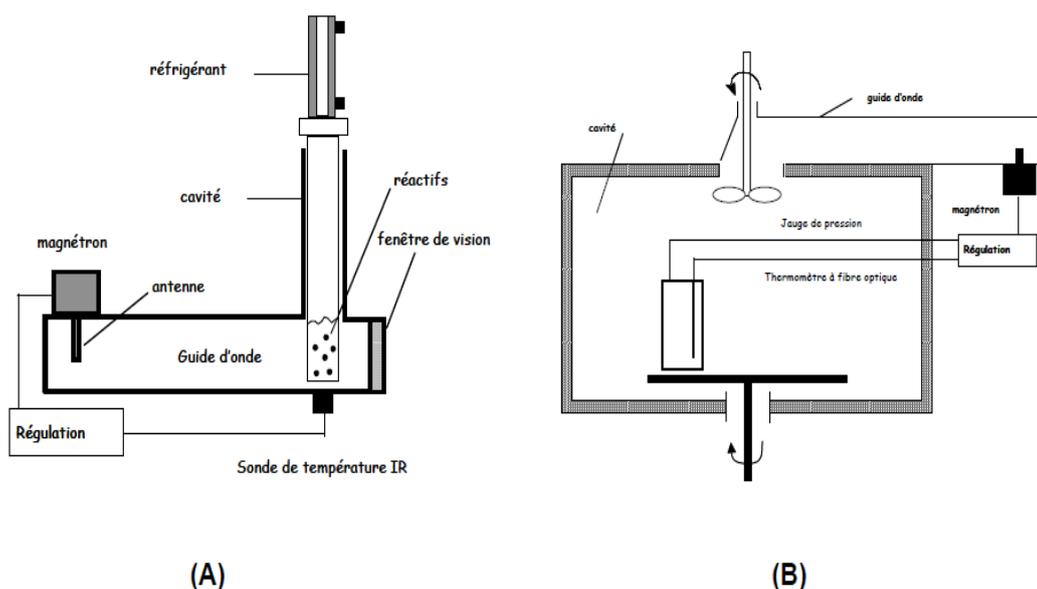


Figure 7: Schéma d'un four à micro-ondes monomode (A) et multimode (B)

Dans un système monomode, les dimensions géométriques de la cavité permettent de conserver un seul mode de propagation, donc d'appliquer une seule configuration de champ sur le produit à traiter. Le facteur qui régit la conception d'une telle cavité est la distance qui sépare le magnétron du produit. La distribution de champ électrique est homogène dans le produit à chauffer. Ce système permet un contrôle précis du champ électrique mais est réservé au traitement de produits de petits volumes. Dans le cas d'un système multimode, la cavité est plus large et les ondes électromagnétiques qui la pénètrent se réfléchissent sur les parois et entraînent une hétérogénéité du champ électrique. Le chauffage des produits n'est donc pas homogène. Cependant, les réacteurs dotés d'un plateau tournant permettent une meilleure homogénéité du chauffage. Ainsi, le chauffage du produit n'est pas dépendant de sa position dans le réacteur micro-ondes (Mandal *et al.*, 2007). Le système multimode permet de traiter une plus grande quantité de produits.

Le principe de chauffage du réacteur micro-ondes est basé sur l'interaction du champ électrique de l'onde avec les composants du produit à traiter. Ainsi en pénétrant le produit, il exerce une force sur les particules chargées. La migration des ions dissous provoque des collisions entre les molécules du fait du changement de signe du champ électrique alternatif. Ces multiples collisions de cette agitation des molécules génèrent de l'énergie et donc

entraîne une élévation de la température (Letellier et Budzinski, 1999). Une caractéristique importante du chauffage par micro-ondes par rapport au chauffage classique est le fait que le chauffage se fait au cœur du milieu réactionnel et de ce fait entraîne une répartition homogène de la température au sein du milieu réactionnel. Cela signifie que des molécules polaires telles que l'eau absorbent l'énergie et la transforment en chaleur transmise au reste du produit. L'interaction micro-ondes/matière se fait donc avec la molécule polaire. Le transfert d'énergie se fait du solvant vers la matière (Kappe, 2004).

I.2.5.3. Facteurs intervenant lors de l'extraction par le réacteur micro-ondes

Nombreux sont les facteurs influençant le chauffage par le micro-ondes. Les paramètres liés à l'appareillage tels que la fréquence, la puissance et le type de cavité sont des facteurs déterminants du chauffage par le micro-ondes. L'influence de la fréquence est liée au fait que la profondeur de pénétration de l'onde dépend de la fréquence du micro-ondes. En plus, l'échauffement du produit est d'autant plus important que la puissance du magnétron est forte. L'influence de la cavité réside dans la différence qui existe entre les cavités monomodes et multimodes. D'autres paramètres comme la température, le temps d'extraction, la nature du solvant et les caractéristiques du produit peuvent influencer l'efficacité du chauffage par le micro-ondes. La température et la puissance du micro-ondes sont étroitement liées et doivent bénéficier d'une attention particulière lorsqu'on travaille avec un récipient fermé. La température peut monter bien au delà du point d'ébullition du solvant utilisé. Ce qui pourrait conduire à une dégradation du produit et à une surpression à l'intérieur du récipient.

Le temps d'extraction est un paramètre dont l'influence est à prendre en compte. Généralement, la quantité de produits extraits est d'autant plus importante que le temps d'extraction est long (Mandal *et al.*, 2007). Cependant, certaines études révèlent que l'augmentation du temps d'extraction n'améliore pas de manière significative le rendement. Par exemple, les résultats d'extraction de capsaïcinoïdes dans des échantillons de poivrons sur un temps variable d'extraction (5, 10, 15 et 20 min) n'ont montré aucune augmentation avec la durée d'extraction (Barbero *et al.*, 2006). Ainsi, une bonne étude d'optimisation du temps d'extraction est nécessaire pour l'extraction de matrices différentes.

Pour la nature du solvant, un choix correct est fondamental pour obtenir une extraction optimale. Le choix du solvant doit être basé sur la solubilité du produit recherché, l'interaction entre le solvant et la matrice et enfin la propriété du solvant à absorber les micro-

ondes (Chen *et al.*, 2008). L'autre facteur important concerne les caractéristiques du produit. En effet, la taille, la forme des particules vont directement influencer la pénétration de l'onde dans la matière.

I.2.5.4. Utilisation des micro-ondes dans la production d'oligosaccharides

De façon générale, l'utilisation des micro-ondes ne se limite pas à l'usage ménagé mais est également utilisé dans l'industrie alimentaire et se développe dans l'industrie chimique. A cet égard, le micro-ondes peut être utilisé pour l'extraction de nombreux composés biologiquement actifs à partir d'une grande variété de ressources naturelles (Sosa-Ferrera *et al.*, 2005; Tsubaki *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010).

L'utilisation du réacteur micro-ondes en chimie a beaucoup évolué depuis son implantation dans les années 1980, comme en témoignent le nombre de publications dans ce domaine, d'environ 500 en 1997 à plus de 2000 à l'heure actuelle. Cependant dans le cas de la production d'oligosaccharides, seuls quelques écrits rapportent des travaux qui traitent de l'utilisation du réacteur micro-ondes. Ces auteurs décrivent cette méthode de dégradation comme très pratique, offrant des temps de réaction courts, des rendements élevés par rapport au chauffage classique et même plus respectueuse de l'environnement. Il s'agit notamment des travaux de :

- Xing *et al.* (2005) dans la préparation d'oligomères de chitosane à partir de carapaces de crevettes.
- De Paula *et al.* (2008) qui ont produit des fructooligosaccharides de DP 4 à 14 à partir de lévane.
- Benko *et al.* (2007) et de Rose et Inglett. (2010) dans la production d'arabinoxyloligosaccharides à partir de fibres de maïs et d'arabinoxyloligosaccharides féruloylés à partir de son de maïs respectivement.
- Hu *et al.* (2013) qui ont obtenu des oligosaccharides d'acide guluronique de DP 1 à 10 à partir d'acide polyguluronique.

Tous ces travaux démontrent que l'utilisation du réacteur micro-ondes dans la production d'oligosaccharides pourrait être transposée à d'autres polysaccharides tels que la pectine.

I.3. Applications potentielles des fragments pectiques

Différents oligosaccharides non digestibles (NDO) sont produits et commercialisés aujourd'hui, dont les plus connus sont les fructooligosaccharides (FOS). Les effets prébiotiques des NDO ont été mis en évidence et de là des effets favorables pour la santé. Les POS présentent un potentiel de développement de nouveaux prébiotiques sur le marché. En plus des effets fonctionnels, les POS présentent d'autres propriétés biologiques intéressantes, pour les végétaux notamment d'où leur ouverture dans la formulation de nouveaux produits phytopharmaceutiques plus respectueux de l'environnement.

I.3.1. Effet prébiotique des fragments pectiques

L'une des caractéristiques les plus importantes des POS comme ingrédients alimentaires est leur capacité à stimuler la croissance des bifidobactéries intestinales. Par exemple, l'utilisation des POS comme source de carbone entraîne une augmentation du nombre de Bifidobactéries, de *Lactobacillus* et d'*Eubacterium rectale* (Olano-Martin *et al.*, 2002 ; Manderson *et al.*, 2005). Les oligosaccharides de faible masse moléculaire (2-4 résidus) sont bifidogènes, toutefois, ils ne sont pas aussi sélectifs que les FOS (Rastall *et al.*, 2002). De plus, le DM joue un rôle important dans les propriétés de fermentation des fragments pectiques. Il a été montré que les POS faiblement méthylés sont de meilleurs substrats pour la croissance des bactéries que ceux hautement méthylés (Dongowski *et al.*, 2002; Olano-Martin *et al.*, 2002). Les perspectives d'utilisation des hydrolysats de pectine dans les préparations pour nourrissons ont montré que ces derniers étaient bien tolérés et présentaient des changements bénéfiques pour la microflore intestinale comme pour l'abaissement du pH fécal (Fanaro *et al.*, 2005). Ainsi, les POS peuvent être intéressants pour imiter les effets bénéfiques des oligosaccharides du lait humain en combinaison avec d'autres prébiotiques.

I.3.2. Utilisation des fragments pectiques dans le domaine de la santé

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont été menées sur les effets des NDO. Certains de ces effets sont eux même en relation avec l'effet prébiotique. Certaines données indiquent des effets cliniquement significatifs qui justifient l'ensemble des travaux actuels (Swennen *et al.*, 2006 ; Gullón *et al.*, 2013). Par exemple, les NDO sont connus pour avoir des effets sur le métabolisme bactérien, la croissance des bactéries dans le colon, la diminution du risque de

cancer, la modulation du système immunitaire, la diminution du cholestérol (Mussatto *et al.*, 2007; Qiang *et al.*, 2009). Les fragments pectiques font partie des NDO et peuvent présenter des effets bénéfiques pour la santé. Ainsi, il a été rapporté que les fragments pectiques pouvaient inhiber l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et ainsi être utilisés comme des agents thérapeutiques. Par exemple, l'acide digalacturonique empêche l'adhésion d'*Escherichia coli* sur les cellules uroépithéliales *in vitro* (Hotchkiss *et al.*, 2003). Olano-Martin *et al.* (2003) ont montré que les POS exerçaient un rôle protecteur en inhibant les shiga-toxines sécrétées par *Escherichia coli* O157:H7. Par ailleurs, certains effets anticancéreux ont été rapportés. Les pectines et les POS sont capables d'induire une mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome HT-29 du colon (Olano-Martin *et al.*, 2003). Des essais réalisés sur des lignées de cellules myéloïdes (Chauhan *et al.*, 2005) et sur des cellules cancéreuses de la prostate (Jackson *et al.*, 2007) ont montré les mêmes effets. Les POS ont également montré leur potentiel de protection contre les maladies cardiovasculaires *in vivo* (Li *et al.*, 2010).

En outre, certains dérivés de la pectine ont été utilisés pour la préparation de vaccins (comme adjuvants) mais aussi en tant que vecteurs dans l'administration de produits pharmaceutiques (Souto-Maior *et al.*, 2010).

I.3.3. Application des fragments pectiques dans le domaine agricole

Dans le domaine agricole, les POS peuvent induire des réponses biologiques chez certaines plantes (on parle de molécules élicitrices). Les oligogalacturonides (OGA) sont impliqués dans les réactions de défense, dans la croissance et le développement des végétaux (Messiaen *et al.*, 1994; Baldan *et al.*, 2003). Ainsi, les essais réalisés sur des pousses de célosie (*Celosia argentea L*) par Suzuki *et al.* (2002) ont montré que leur croissance était améliorée en présence d'acide polygalacturonique de DP 8. Des OGA de DP supérieur à huit stimulent la croissance des cellules de carotte en suspension (*Daucus carota*) mais aussi la croissance de plants de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Van Cutsem *et al.*, 2008).

Il a également été rapporté que les OGA sont capables d'induire la floraison sur des explants de tabac. Ils stimulent aussi la différenciation cellulaire du pérycyle et favorisent la maturation des tomates et d'autres fruits. Les OGA inhibent cependant l'élongation de la tige du pois (Marfa *et al.*, 1991; Dumville *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2001; Baldan *et al.*, 2003). La plupart des réponses biologiques sont obtenues avec des OGA de DP variant de 10 à 16 dont

le plus actif est de l'ordre de 12 (Messiaen *et al.*, 1994; Ridley *et al.*, 2001; Baldan *et al.*, 2003). Plusieurs travaux indiquent cependant que les OGA autres que ceux de DP 10 à 16 peuvent être biologiquement actifs. Par exemple, les OGA de DP 2 provoquent l'inhibition des protéases dans les plants de tomate. De plus les DP 2 et 3 insaturés à l'extrémité non réductrice sont actifs. Les OGA de DP 2 à 6 induisent la biosynthèse d'éthylène chez les plants de tomate, le pentasaccharide (DP 5) étant le plus actif. Au cours de la maturation de la tomate, le triacide galacturonique (DP 3) inhibe la production de l'endopolygalacturonase (Ridley *et al.*, 2001).

I.4. Conclusion

Utilisées depuis longtemps comme agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaississants, les pectines sont une source potentielle d'ingrédients pour des aliments santé. Les progrès réalisés dans la connaissance des enzymes de clivage des pectines ont mené au développement d'oligosaccharides non digestibles : les fragments pectiques (oligosaccharides acides dérivés de pectines). Mais au-delà de la voie enzymatique, certains traitements physiques peuvent également être utilisés: thermiques, micro-ondes, irradiation γ et ultrasonication. Ces fragments pectiques qui sont encore produits à l'échelle du laboratoire montrent des applications prometteuses. Ils trouvent des applications potentielles dans des domaines divers, alimentaires ou non alimentaires. Leurs principales applications comprennent la fonction élicitrice chez certaines plantes, la protection contre le cancer du colon, la stimulation de la croissance de bactéries bénéfiques dans le colon (prébiotiques), l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales mais aussi l'induction d'une mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome du colon.

La partie bibliographique a permis de mettre en évidence l'importance des propriétés des fragments pectiques, d'où la nécessité de continuer à travailler sur les hydrolysats de pectines.

OBJECTIFS ET STRATEGIE

OBJECTIFS ET STRATEGIE

Les pectines sont des polysaccharides très complexes d'origine végétale qui ont fait l'objet de nombreuses recherches pendant plusieurs années. Ces recherches ont porté sur l'étude structurale, la fonction et la caractérisation des pectines. A l'heure actuelle, un regain d'intérêt est porté aux pectines grâce à de nouvelles valorisations de ces dérivés, notamment la production d'oligosaccharides pectiques, reconnus comme une nouvelle classe de molécules bioactives. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail. Il s'adresse plus particulièrement à la production d'oligogalacturonides à partir de pectine de betterave qui n'a jusqu'à présent été utilisée que dans un nombre limité d'applications.

Trois objectifs principaux sont visés dans ce travail :

Le premier objectif est d'opérer un choix d'enzymes présentant une efficacité à produire des POS en étudiant un ensemble de préparations commerciales.

La mesure des activités pectinolytiques et le contrôle de la pureté des différentes préparations ont été réalisés. La cinétique de dégradation de pectines a également été étudiée. A cet effet, un substrat pectique modèle (acide polygalacturonique) a été utilisé. L'application de la chromatographie échangeuse d'anions a été utilisée pour la caractérisation des hydrolysats et plus particulièrement pour l'identification et la quantification des degrés de polymérisation.

Le deuxième objectif est d'étudier les caractéristiques physico-chimiques des POS produits, suite au choix d'enzyme effectué. A cet égard, un substrat pectique complexe (pectine de betterave) a été utilisé. Sa caractérisation a été ainsi investiguée. Les techniques chromatographiques telles que l'HPSEC et l'HPAEC-PAD ont été utilisées pour le suivi de l'hydrolyse de la pectine de betterave. Ainsi, pour étudier les propriétés des POS obtenus en relation avec leur composition, diverses méthodes de caractérisation physique, telles que l'analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, l'analyse calorimétrique différentielle et la diffraction des rayons X ont été utilisées.

Le troisième objectif est d'étudier les potentialités du réacteur micro-ondes pour la dégradation de la pectine de betterave en misant sur trois variables (température, pH et le temps) par le biais d'un plan expérimental. L'influence de ces trois variables sur la production de POS et d'acide galacturonique est étudiée, en vue de définir les meilleures conditions de production de POS tout en libérant moins d'acide galacturonique. Les techniques HPSEC et HPAEC-PAD ont été utilisées pour le suivi de l'hydrolyse. L'aspect lié à la dégradation des sucres en fonction de la sévérité du traitement a été aussi abordé. La stratégie expérimentale pour la production et la caractérisation des POS est illustrée à la figure 8.

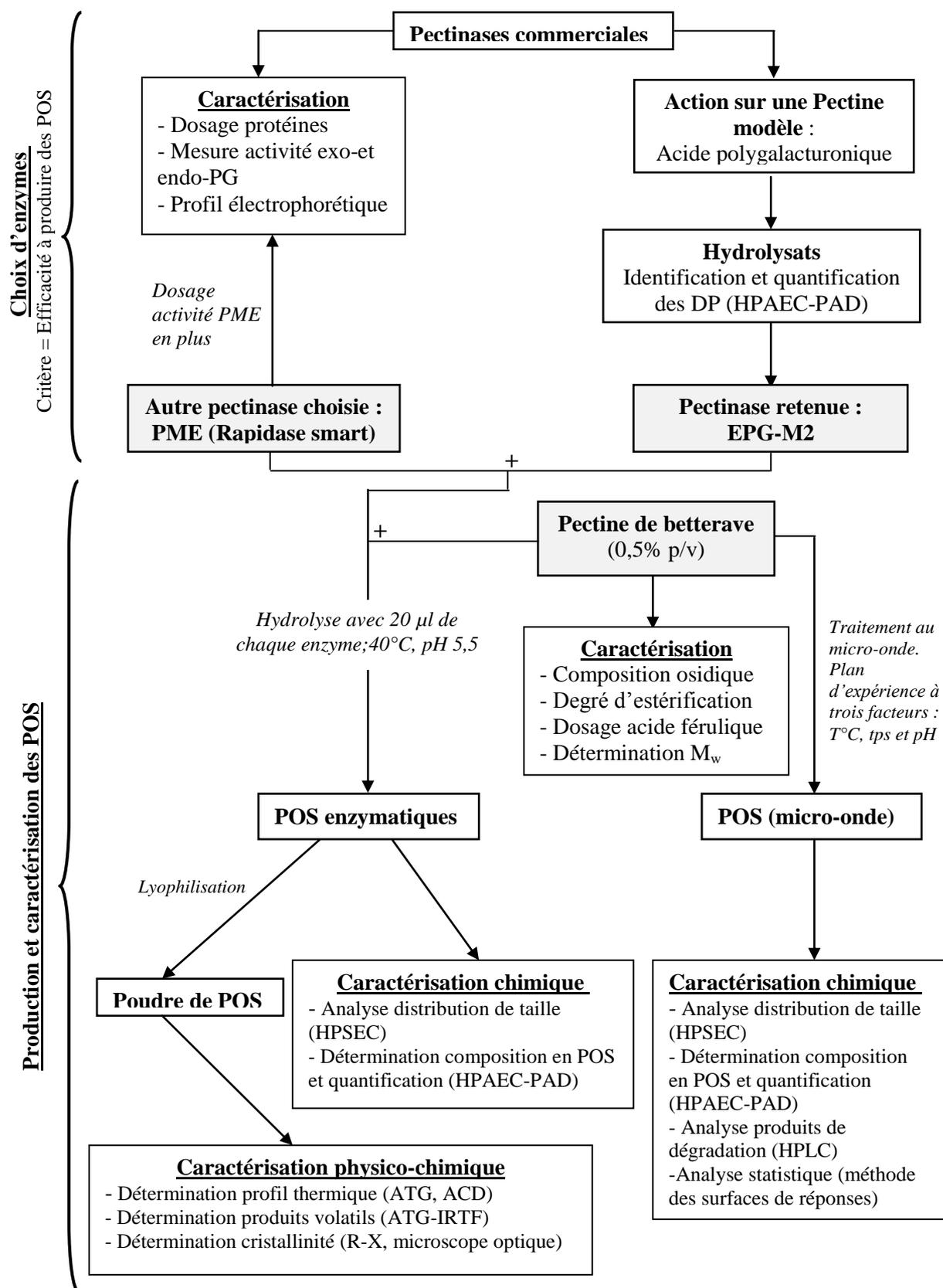


Figure 8 : Stratégie expérimentale utilisée pour la production et la caractérisation des POS.

MATERIELS ET METHODE

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériels

II.1.1. Solvants et réactifs utilisés

Les solvants et réactifs utilisés tout au long de ce travail sont consignés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des solvants et réactifs utilisés

Noms	Références	Pureté (%)	Fournisseurs
Acide galacturonique (AGA)	48280	≥ 97	Fluka
Acide digalacturonique (DiAGA)	D4288	≥ 85	Sigma
Acide trigalacturonique (TriAGA)	T7407	90	Sigma
D-galactose	48260	≥ 99	Fluka
D-glucose	G8270	≥ 99,5	Sigma
D-arabinose	A6085	≥ 99	Sigma
L-rhamnose	83650	≥ 99	Fluka
D-xylose	X3877	≥ 99	Sigma
D-mannose	63582	≥ 99	Fluka
2-déoxy-D-glucose	D8373	≥ 98	Sigma
Acide succinique	23968-2	≥ 99	Sigma
Acide acétique	20103.330	≥ 99,8	VWR
Méthanol	ME03152500	99,99	Rocc (Scharlau)
Acide glucuronique (AGU)	309880250	98	Acros Organics
Acide borique	1.00165	≥ 99,5	Merck
Acide cyano-2-acétamide	108448	99	Sigma
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	20704.320	95	VWR
Diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO)	41640	≥ 99,9	Sigma
Borohydrure de sodium (NaBH ₄)	452882	≥ 98	Sigma
Dichlorométhane (CH ₂ Cl ₂)	CL03472500	≥ 99,8	Rocc (Scharlau)
Hydroxyde d'ammonium NH ₄ OH	255210025	Extra pure 25%	Acros Organics
1-méthylimidazole	336092	≥ 99	Sigma
Anhydride acétique	21390.330	98	VWR
Acétate de sodium trihydraté	32318	99	Sigma
Hydroxyde de sodium (NaOH) (solution à 50%)	5671-02	50	Baker
Isopropanol	AL03212500	≥ 99,9	Rocc (Scharlau)
Sodium azide (NaN ₃)	71290	≥ 99	Sigma
Nitrate de sodium (NaNO ₃)	71755	≥ 99	Sigma
Ether diéthylique	23811.326	99,5	Rocc (Scharlau)
Trans acide cinnamique	C80857	99	Sigma
Acide trifluoroacétique (TFA)	080217	99	SdS
Acide férulique	128708	> 99	Sigma
Acide chlorhydrique (HCl)	20252.420	37	VWR
Chlorure de sodium (NaCl)	27808.297	9,9	VWR

II.1.2. Substrats utilisés

- Acide polygalacturonique (Fluka, 81325)
- Pectine de citron (Sigma P-9135, AGA > 74%)
- Pectine de betterave

Elle est extraite au laboratoire à partir de pulpes de betterave à pH 1,25 et à la température de 80°C pendant 2h. Après filtration sous vide dans des büchners plongés dans la glace sur filtre nylon de 100 puis de 25 µm, le filtrat est neutralisé avec de l'hydroxyde de sodium 10 M à pH entre 6,5 et 7. Il est ensuite concentré par ultrafiltration sur une cartouche fibreuse de 50 kDa puis précipité à l'éthanol 98% équivalent à 3 fois le volume du filtrat. Les pulpes de betterave utilisées ont été fournies par la société Cosucra Groupe Warcoing SA (Belgique).

- Pectine de betterave déstérifiée par voie chimique

5 grammes de pectine de betterave sont dissous dans 500 ml d'eau distillée à température ambiante. Le pH de la solution est ajusté à 11 avec de l'hydroxyde de sodium 1 M sous agitation. Le pH est maintenu constant par ajout d'hydroxyde de sodium (1 M) à l'aide d'un titrateur pH-stat automatique (718 Stat Titrino, Metrohm). Après 7 heures de réaction, le pH est porté entre pH 3-4 par ajout de 1 M d'acide chlorhydrique. La solution de pectine est précipitée par après avec trois volumes d'éthanol 96%, centrifugée puis séchée à l'air libre.

II.1.3. Enzymes utilisées

Un total de sept pectinases commerciales de nature « food grade » ou de « qualité alimentaire » dont une pectinéméthylestérase (Rapidase Smart®) ont été utilisées (Tableau 6).

Tableau 6: Liste des préparations commerciales utilisées (liquides)

Enzymes	Fournisseur	Source	Conditions de travail	
			Température (°C)	pH
EPG-M2	Megazyme	<i>A. aculeatus</i>	40	5,5
Pectinase P-4716*	Sigma	<i>A. niger</i>	20 - 60 (40)	3,0 - 5,0 (3,8)
Viscozyme L	Sigma	<i>A. aculeatus</i>	25 - 55 (35)	3,3 - 5,5 (4,0)
Pectinex Ultra SP-L	Novozymes	<i>A. aculeatus</i>	En dessous de 45 (35)	4,5 - 6,0 (4,5)
Pectinase 62L	Biocatalysts	<i>A. sp</i>	10 - 55 (37)	3,0 - 5,0 (5,0)
Macer8 FJ	Biocatalysts	<i>A. sp</i>	40 - 60 (40)	3,0 - 5,0 (5,0)
Rapidase Smart®	DSM	<i>A. aculeatus</i>	40	4,5 - 5,5 (5,5)

* : Température et pH optimum déterminés par nous.

() : Conditions expérimentales utilisées dans ce travail.

II.2. Méthodes

II.2.1. Composition chimique des pectines

II.2.1.1. Détermination de la matière sèche

Environ 500 mg (m_0) d'échantillon de pectine sont pesés dans une conserve préalablement tarée (m_1). Les conserves sont placées à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. Elles sont ensuite refroidies dans un dessiccateur et pesées à nouveau (m_2). La matière sèche est déterminée d'après l'équation 1 ci-dessous. La mesure est réalisée en triple.

$$\text{Matière sèche (\%)} = \left[\frac{m_2 - m_1}{m_0} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

II.2.1.2. Dosage des monosaccharides par chromatographie gazeuse (CPG)

La nature des monosaccharides, composants des polysaccharides a été déterminée après hydrolyse au moyen d'acide sulfurique 1 M suivie de la conversion des résidus d'hydrolyse en acétates d'alditols selon la méthode décrite par Blakeney *et al.*, (1983).

- Principe

Le dosage des sucres neutres de la pectine est réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après dérivatisation en acétates d'alditols. Après hydrolyse acide de la pectine, les monosaccharides sont réduits par le tétraborate de sodium (NaBH_4) puis dérivatisés en acétates d'alditols par l'anhydride acétique en présence de 1-méthylimidazole utilisé comme catalyseur. Les acétates d'alditols sont ensuite récupérés dans du dichlorométhane puis analysés par CPG.

- Préparation des acétates d'alditols à partir de la pectine

- Peser environ mais précisément 50 mg de pectine et ajouter 3 ml de H_2SO_4 (1 M) tout en agitant au vortex
- Hydrolyser à 100°C pendant 3 heures

- Refroidir dans de la glace et ajouter goutte à goutte du NH_4OH 15 M jusqu'à ce que le pH soit neutre ou alcalin
- Ajouter 1 ml d'une solution de standard interne à 1 mg/ml
- Prélever environ 400 μl de cette solution et les placer dans un tube de dérivation
- Ajouter 2 ml de la solution de tétraborate de sodium dans le DMSO et laisser réagir 90 min à 40°C
- Ajouter 0,6 ml d'acide acétique glacial 18 M
- Ajouter 0,4 ml de 1-méthylimidazole et 4 ml d'anhydride acétique
- Après 15 min, ajouter 10 ml d'eau distillée
- Après refroidissement, ajouter 3 ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2)
- Récupérer 1 ml de la phase inférieure, injecter en chromatographie en phase gazeuse ou stocker à -20°C

Pour les standards de monosaccharides:

- Peser 20 mg de chaque monosaccharide (rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose) et de l'étalon interne (2-déoxy-D-glucose) dans un ballon jaugé de 100 ml
- Ajouter 200 μl de NH_4OH 15 M
- Porter à 100 ml avec de l'eau distillée et reprendre au point 5 comme ci-dessus.

NB : A chaque ajout d'une solution, agiter au vortex. Ne pas oublier de refermer les bouchons sauf pour les étapes 8 et 9.

● Conditions d'analyse

Les sucres neutres sont analysés par CPG avec un appareil Hewlett Packard HP 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne capillaire HP1 méthyle siloxane (30m \times 0,32mm \times 2,25 μm). La température de l'injecteur (mode splitless) et du détecteur est respectivement de 250°C et de 320°C. Le four est chauffé à 120°C et augmente linéairement de 4°C/min jusque 220°C pour éluer les différents sucres. La température est ensuite portée à 290°C à raison de 35°C/min dans le but de nettoyer la colonne. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium.

● Expression des résultats

Pour chaque monosaccharide étalon, le facteur de réponse (équation 2) est calculé par rapport au standard interne (2-déoxyglucose) sur base des données du chromatogramme d'un mélange de monosaccharides commerciaux. Le facteur de réponse permet de corriger la surface du pic

de chaque monosaccharide afin de tenir compte des différences de réponses du détecteur pour chaque monosaccharide. La masse du monosaccharide est calculée à partir du rapport de sa surface corrigée à la surface du standard interne (équation 3).

$$F_r = \frac{M_{mono} \times S_{déoxy}}{M_{déoxy} \times S_{mono}} \quad (\text{Eq. 2})$$

avec S = surface du pic, M = masse (mg).

$$M_{mono} = \frac{F_r \times M_{déoxy} \times S_{mono}}{S_{déoxy}} \quad (\text{Eq. 3})$$

II.2.1.3. Dosage de l'acide galacturonique par chromatographie échangeuse d'anions

L'acide galacturonique est le constituant principal de la pectine. Il est dosé par chromatographie échangeuse d'anions couplée à un détecteur ampérométrique (HPAEC-PAD) après hydrolyse enzymatique de la pectine. L'utilisation d'un détecteur ampérométrique permet une quantification directe, sans dérivation des hydrates de carbone. L'HPAEC tire avantage de la nature acide faible des hydrates de carbone. Dans les conditions de l'analyse, à pH élevé, ils sont partiellement ionisés et peuvent donc être séparés par le mécanisme d'échange d'anions. Les hydrates de carbone séparés sont alors détectés par la mesure du courant électrique généré par leur oxydation à la surface de l'électrode en or du détecteur.

- **Mode opératoire**

Une solution de pectine est préparée à environ 2 mg/ml. Elle est ensuite filtrée sur un filtre de 0,45 µm puis la matière sèche est déterminée en séchant 20 ml de solution à 106°C pendant 24 heures.

Dans un flacon Schott de 50 ml, 10 g de solution de pectine filtrée sont pesés. Le flacon est incubé dans un bain marie à 48°C sous agitation. Une fois à température, 10 ml de solution enzymatique (Viscozyme L) diluée 500 fois dans du tampon acétate de sodium (50 mM, pH4,5-4,6) sont ajoutés. Le mélange est incubé à 48°C pendant 2 heures sous agitation.

Après 2 heures d'hydrolyse, l'enzyme est immédiatement inactivée en chauffant le mélange à 100°C pendant 10 min. Après refroidissement, le mélange est transvasé dans un ballon de 100 ml contenant 1 ml d'acide glucuronique à 2 g/200ml (standard interne) puis mise au trait.

Avant injection à l'HPAEC-PAD, la solution est filtrée sur un filtre de 0,45 µm (Acrodisc Gelman).

- Conditions d'analyse

Le système Dionex modèle ICS-3000 (Sunnyvale, CA, USA) est équipé d'une colonne échangeuse d'anions CarboPac PA 100 (250 mm × 4 mm de diamètre) et d'une précolonne CarboPac PA 100 (40 mm × 4 mm de diamètre), d'un passeur automatique d'échantillon, d'une pompe à gradient et d'un détecteur électrochimique ED-3000 (ampérométrie pulsée). Le programme d'élution par gradient est présenté dans le tableau 7.

Tableau 7 : Programme d'élution avec A (NaOH 100 mM), B (NaOH 100 mM + acétate de sodium 600 mM) et C (NaOH 500 mM)

Temps d'élution (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Etape de la programmation
0	100	0	0	Conditionnement
5	100	0	0	Conditionnement
7	75	25	0	Elution
15	75	25		Elution
15,5	0	50	50	Lavage
25		50	50	Lavage
25,5	100			Conditionnement
35	100	0	0	Conditionnement

Les séparations sont réalisées à la température de 30°C et à un débit de 1 ml/min.

- Expression des résultats

Le facteur de réponse de l'acide galacturonique est calculé par rapport au standard interne (acide glucuronique) grâce à la droite d'étalonnage suivant l'équation 4:

$$F_r = \frac{[AGA] \times S_{AGU}}{[AGU] \times S_{AGA}}$$

(Eq. 4)

avec S = surface du pic, [] = concentration en ppm, AGA = acide galacturonique et AGU = acide glucuronique.

La teneur en AGA de la pectine est calculée selon l'équation 5 :

$$\% \text{AGA} = \frac{F_r \times [AGU] \times \text{Vol}_{\text{final}} \times 100}{M_{\text{sol}} \times [\text{sol}] \times S_{AGU} \times 1000}$$

(Eq. 5)

avec $\text{Vol}_{\text{final}}$ = volume total (100ml), M_{sol} = masse de la solution de pectine (g), $[\text{sol}]$ = concentration de la solution (mg/ml).

II.2.1.4. Détermination du degré de méthylation (DM) et d'acétylation (DA)

La méthode utilisée pour le dosage du degré de méthylation et d'acétylation qui est décrite par Voragen *et al.* (1986), permet de doser respectivement le méthanol et l'acide acétique après saponification de la pectine avec de la soude. Ces deux constituants sont dosés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une colonne à exclusion d'ions et un détecteur à indice de réfraction (RI). L'acide succinique est utilisé comme standard interne.

- Mode opératoire

- A 100 mg de pectine, ajouter 2 ml du réactif isopropanol/ NaOH 0,2 M (1/1), agiter au vortex et laisser réagir 2 heures au frigo (4°C)
- Ajouter 1 ml de solution d'acide succinique (250 mg/250 ml) et agiter au vortex
- Centrifuger l'échantillon à 2000 rpm pendant 5 minutes

- Récupérer le surnageant et filtrer sur un filtre de 0,45 µm

Pour les standards (méthanol et acide acétique), des solutions mixtes sont préparées par dilution dans des ballons jaugés de 100 ml.

- Conditions d'analyse

Le module de séparation (Waters 2690 alliance) est équipé d'une colonne échangeuse d'ions Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm, Bio-rad Labs) avec une précolonne (AG50W-X4, 50 × 4,6 mm, Bio-rad Labs) placée dans un four thermostaté à 30°C. Le détecteur utilisé est un réfractomètre Waters 410 fixé à 40°C. L'élution du méthanol et de l'acide acétique est effectuée en mode isocratique avec 5 mM d'acide sulfurique titrisol (Merck). Le débit est de 0,6 ml/min et le volume d'injection est de 100 µl.

II.2.1.5. Dosage de l'acide férulique

L'acide férulique a la capacité d'absorber les rayonnements UV. Sa détection après extraction et saponification, s'effectue par HPLC couplée à un détecteur UV à 320 nm. L'acide cinnamique utilisé comme étalon interne, absorbe quant à lui à 280 nm. Afin de déterminer le facteur de réponse de ces deux constituants, mais aussi de pallier les imprécisions éventuelles dues à l'étape d'extraction, un étalonnage externe a été effectué par une gamme d'acide férulique et d'acide cinnamique.

- Mode opératoire

- Peser 500 mg de pectine dans un flacon Schott de 100 ml

- Ajouter 30 ml de solution de NaOH (2 M) en agitant tout doucement afin d'hydrater la matrice

- Hydrolyser pendant 2 heures à 30°C sous agitation dans un bain thermostaté à l'abri de la lumière et sous atmosphère anaérobie. Pour ce faire, les flacons sont entourés de papier aluminium et un flux d'azote est barboté dans le flacon avant de les fermer hermétiquement.

- Après hydrolyse, ajouter 1 ml d'une solution d'acide cinnamique à 5 g/l dans du NaOH (0,2 M)

- Acidifier à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique 3 M (virage au blanc)

- Transvaser dans les godets à centrifuger et extraire les acides phénoliques avec un volume d'éther diéthylique (~ 30 ml)
- Centrifuger à 5000 tr/min pendant 5 min
- Récupérer le surnageant et recommencer l'extraction avec un second volume d'éther diéthylique
- Evaporer les surnageants combinés à l'évaporateur rotatif à 40°C
- Reprendre dans 10 ml de méthanol 50 % puis filtrer sur un filtre de 0,45 µm.

- Droite d'étalonnage

Des solutions stock de 1 mg/ml d'acide férulique et de 0,25 mg/ml d'acide cinnamique sont préparées dans des ballons jaugés de 100 ml. Ainsi, pour la solution d'acide férulique, 100 mg sont pesés dans un ballon de 100 ml et 5 ml de méthanol sont ajoutés avant la mise à niveau. De même pour la solution d'acide cinnamique, 25 mg sont pesés dans un ballon de 100 ml et 5 ml de méthanol sont ajoutés avant la mise à niveau. La gamme d'étalonnage est obtenue en diluant la solution stock d'acide férulique dans des ballons jaugés de 100 ml et en ajoutant le même volume de solution stock d'acide cinnamique avant de compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Conditions d'analyse

Le module de séparation (Waters 2690 alliance) est équipé d'une colonne en phase inversée Agilent zorbax 300 SB-C18 (150 mm × 4,6 mm ID, 5 µm). La détection est réalisée par un détecteur UV (Waters 996 Photodiode Array Detector). L'élution est réalisée avec 75% de solvant A (eau Milli-Q + 0,05% d'acide trifluoroacétique) et 25% de solvant B (acétonitrile + 0,05% d'acide trifluoroacétique) à un débit de 1 ml/min. La température de la colonne est maintenue à 35°C et le volume d'injection est de 25 µl.

II.2.1.6. Détermination de la masse moléculaire

La chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC) couplée au détecteur à indice de réfraction (RI) et/ou à la triple détection est utilisée pour déterminer la masse moléculaire de la pectine. Le système de triple détection est constitué d'un détecteur RI, d'un détecteur à diffusion de lumière à angle droit (RALLS) et d'un détecteur viscosimétrique. Le signal du réfractomètre est proportionnel à la concentration et au rapport dn/dc , le signal du viscosimètre est

proportionnel à la viscosité et à la concentration, le signal du détecteur à diffusion de lumière est proportionnel à la masse moléculaire et au rapport dn/dc .

$$\text{Réfractomètre (RI)} = K_{RI} \times C \times (dn/dc)^2$$

$$\text{Viscosimètre} = K_{visc} \times C \times \eta$$

$$\text{Diffusion de lumière (LS)} = K_{LS} \times C \times M_w \times (dn/dc)^2$$

Avec comme variables :

C : la concentration (mg/ml)

M_w : la masse moléculaire moyenne en poids (kDa)

K : le facteur de proportionnalité

η : la viscosité intrinsèque

dn/dc : incrément d'indice de réfraction avec la concentration

La séparation des molécules se fait par exclusion stérique. A l'inverse de l'HPLC, aucune interaction chimique ne se produit lors de la séparation, la séparation repose sur des interactions physiques d'autant plus importantes que les molécules sont petites. Le système de détection permet de déterminer les masses moléculaires moyennes en masse (M_w) et en nombre (M_n), mais également le rayon de giration (R_g), la viscosité intrinsèque ainsi que l'indice de polydispersité M_w/M_n .

- Mode opératoire

- Solubiliser 200 mg de pectine dans 100 ml d'eau distillée tout en agitant,
- Filtrer sur un filtre nylon de 11 μm puis sur un filtre nylon de 0,45 μm
- Déterminer la concentration exacte de la solution de pectine en séchant environ mais précisément 20 ml de cette solution à 105°C pendant 24 heures,
- Injecter 100 μl en HPSEC (waters 2690 Alliance) avec une colonne TSK GPWxl (300 mm \times 7,8 mm) et couplé en ligne avec trois détecteurs: un réfractomètre différentiel Waters 2410, un RALLS, et un viscosimètre différentiel (Modèle T-50A, Viscotek, Houston, TX, USA). La phase mobile est une solution de nitrate de sodium (NaNO_3) 0,05 M contenant 500 mg d'azide de sodium (NaN_3) à un débit de 0,7 ml/min.

II.2.2. Méthode pour la caractérisation des préparations enzymatiques

II.2.2.1. Dosage des protéines

La teneur en protéines des solutions enzymatiques a été dosée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le kit de la marque Bio-rad. Elle utilise du bleu de Coomassie G250 dont la forme leuco (brun orange) est convertie en forme bleue caractéristique du complexe formé entre les groupements NH_3^+ des protéines et ce réactif. L'intensité de la coloration dépend donc de la quantité d'acides aminés présents. A 20 μl de solution enzymatique préalablement diluée (20 fois) sont ajoutés 1 ml de réactif de Bradford. Après homogénéisation et incubation à température ambiante pendant 5 minutes, l'intensité de la coloration est déterminée au spectrophotomètre UV-visible (Ultrospec 4000 Pharmacia, England) à 595 nm contre un témoin contenant tous les réactifs excepté l'extrait protéique. La teneur en protéines est déterminée par référence à une gamme étalon préparée à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin à 2 mg/ml. Les mesures ont été réalisées en triple.

II.2.2.2. Détermination des activités enzymatiques, des propriétés physico-chimiques et moléculaires des pectinases commerciales

Pour l'ensemble des enzymes commerciales utilisées, l'activité polygalacturonase (exo et endo) a fait l'objet d'un contrôle au laboratoire. Les conditions optimales de certaines enzymes indiquées par les fournisseurs ont été utilisées et elles ont été déterminées quand non disponibles (cas de la Pectinase P-4716). L'activité pectinéméthylestérase a fait l'objet d'un contrôle dans la Rapidase Smart® aux conditions décrites dans le tableau 6.

II.2.2.2.1. Détermination du pH optimum et de la stabilité au pH de la Pectinase P-4716

La détermination du pH optimum d'hydrolyse de la Pectinase P-4716 a été réalisée dans une gamme de pH comprise entre 3 et 5 en utilisant du tampon acétate 0,1 M. Le mélange réactionnel est composé de 350 μl de solution de pectine de citron à 0,2% dans du tampon acétate 0,1 M aux différents pH indiqués et de 50 μl de solution enzymatique diluée 50 fois avec les solutions tampons aux différents pH. Ce mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 10 minutes dans un bain-marie à 40°C. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de

tampon borate 0,1 M pH 9 suivi de l'ajout de 0,4 ml du réactif cyano-2-acétamide (1%). Le mélange est agité puis chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV-visible (Ultrospec 4000 Pharmacia, England) à 276 nm (Verlent et *al.*, 2005) contre un blanc enzyme et un blanc substrat.

Pour la stabilité au pH, la solution enzymatique est diluée 50 fois avec les solutions tampons aux différents pH et conservée à 4°C pendant 24 heures. Les tests sont ensuite réalisés comme précédemment. Les mesures ont été réalisées en double.

II.2.2.2.2. Détermination de la température optimale et de la stabilité à la température de la Pectinase P-4716

La température optimale est recherchée sur une gamme de températures comprises entre 20 et 70°C. Pour la stabilité à la température, la solution de pectinase est portée à des températures comprises entre 20 et 70°C pendant 10 minutes puis refroidie dans de la glace à température ambiante. Les tests de température optimale et de stabilité à la température sont ensuite réalisés sur une solution de pectine de citron à pH 3,8. Le reste du protocole est identique à celui réalisé au point IV.2.2.2.1.

II.2.2.2.3. Activité polygalacturonase (PG) contenue dans les différentes préparations commerciales

Les PG (exo et endo) catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1→4) des polymères pectiques en générant de l'acide galacturonique et des oligomères d'acide galacturonique. Pour la mesure de l'activité PG, deux méthodes ont été développées. La mesure de la viscosité et du pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la différence entre les activités endo-PG et exo-PG. Dans ce travail, la mesure de la viscosité et la méthode au cyano-2-acétamide basée sur la mesure du pouvoir réducteur ont été utilisées.

II.2.2.2.3.1. Dosage de l'activité exo-PG par la méthode au cyano-2-acétamide

En milieu alcalin et à chaud, le cyano-2-acétamide en solution aqueuse réagit avec les fonctions réductrices pour former par condensation puis par cyclisation un complexe dont le maximum d'adsorption se situe à 276 nm (Verlent *et al.*, 2005).

- Mode opératoire

A 0,5 ml d'une solution d'acide polygalacturonique préparée à 0,2% dans du tampon acétate au pH de l'enzyme, sont ajoutés 0,5 ml de solution enzymatique diluée 3000 fois. Le mélange réactionnel est incubé à la température de l'enzyme sous agitation pendant 10 min. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de tampon borate et 1 ml du cyano-2-acétamide. Le mélange est porté à 100°C pendant 10 min. Après refroidissement dans de la glace jusqu'à la température ambiante, la densité optique est lue à 276 nm contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions. Une gamme étalon d'acide galacturonique de 0 à 70 µg/ml est réalisée dans les mêmes conditions. Les mesures ont été réalisées en double. Une unité (U) d'activité exo-PG est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol d'acide galacturonique par millilitre et par minute dans les conditions expérimentales. Elle est calculée suivant la formule ci-dessous.

$$\text{Activité exo-PG (U/ml)} = \Delta DO (1/p) \times d \times (1/v \times t) \quad (\text{Eq. 6})$$

ΔDO : différence de densité optique entre l'échantillon et le blanc

p : pente de la courbe étalon

d : facteur de dilution de la solution enzymatique

v : volume enzymatique

t : temps d'incubation

II.2.2.3.2. Dosage de l'activité endo-PG par la mesure de la viscosité

Cette méthode est basée sur la mesure de la diminution de la viscosité d'une solution de pectine causée par l'action de la forme « endo » de l'enzyme à l'aide du viscosimètre Brookfield (modèle LVT, Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts, USA).

Le principe de fonctionnement du viscosimètre Brookfield consiste à faire tourner à vitesse fixe un mobile de taille fixe immergé dans un liquide par l'entremise d'un ressort. La

résistance du produit au mouvement de rotation du mobile est enregistrée à l'aide d'un ressort interne, puis convertie en unité viscosimétrique (centipoise ou millipascal seconde).

- Mode opératoire

250 ml d'une solution de pectine de citron préparée à 3% dans du tampon citrate-phosphate au pH de l'enzyme est équilibrée et maintenue à la température optimale de l'enzyme (cf. paragraphe II.1.3). La viscosité de cette solution est mesurée avec le Brookfield au taux de cisaillement de 30 tours/min en utilisant le mobile LV-2. La réaction de diminution de la viscosité est alors initiée en ajoutant 1 ml de solution enzymatique diluée 500 fois préincubée à la température de l'enzyme. La mesure de la diminution de la viscosité est faite sur un intervalle de temps de 30 minutes. Le dosage de l'activité est fait contre un blanc traité de la même façon avec l'enzyme préalablement inactivée. Les mesures ont été réalisées en double. Une unité (U) de l'activité endo-PG est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire de 50% la viscosité initiale de la solution de pectine de citron par minute dans les conditions décrites ci-dessus. L'activité endo-PG a été calculée suivant la formule ci-dessous.

$$\text{Activité endo-PG (U/ml)} = ([p/50] \times [V/v]) \times d \quad (\text{Eq. 7})$$

avec:

p : pente de la partie linéaire de la courbe de réduction de la viscosité

V/v : volume mélange réactionnel / volume enzyme utilisé

d : facteur de dilution de la solution enzymatique avant l'essai

II.2.2.2.4. Dosage de l'activité pectinéméthylestérase (PME) contenue dans la Rapidase Smart®

La PME hydrolyse les liaisons esters méthyliques des résidus d'acide galacturoniques de la pectine. Au cours de la réaction, du méthanol est libéré suivi de l'apparition de nouvelles fonctions carboxyliques libres. Le dosage des fonctions acides et du méthanol permet de calculer l'activité enzymatique. Dans notre travail, la méthode par titrage des fonctions acides à l'aide du titrateur automatique (718 Stat Titrino, Metrohm) a été retenue.

- Mode opératoire

30 ml d'une solution de pectine de citron à 0,5% dans du NaCl 0,15 N, pH 5, sont stabilisés à 40°C. 100 µl de Rapidase Smart® dilué 100 fois dans du NaCl 1,7 N ajusté à pH 5 et équilibré à 40°C sont ajoutés. Le milieu réactionnel est incubé sous agitation toujours à 40°C pendant 10 minutes en maintenant la valeur du pH par ajout de NaOH 0,02 N. Le volume de NaOH utilisé est proportionnel à la quantité de fonctions carboxyliques libérées. Un blanc est réalisé dans les mêmes conditions avec de l'enzyme inactivée. Les mesures ont été réalisées en double. Une unité PME est définie comme la quantité d'enzymes nécessaire pour libérer une micromole de groupes carboxyliques par millilitre et par minute à pH 5,5 à 40°C. L'activité PME est calculée suivant la formule ci-dessous.

$$PME(U / ml) = \frac{Molarité_{NaOH} \times ml_{NaOH} \times Fd \times 1000}{Temps(min) \times ml_{enzyme}} \quad (Eq. 8)$$

avec *Fd* : facteur de dilution de la solution enzymatique

II.2.2.2.5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des préparations enzymatiques

La pureté des préparations enzymatiques commerciales est estimée à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalisée dans des conditions dénaturantes selon Laemmli (1970). C'est une technique couramment utilisée pour séparer les sous-unités protéiques et déterminer leur masse moléculaire. Les enzymes, dans un tampon Tris-HCl 125 mM à pH 6,8 contenant du SDS (10%, m/v), du β-mercaptoéthanol (1%, v/v), du glycérol (20%, m/v) et du bleu de bromophénol (0,02%, m/v), ont été dénaturées par un traitement thermique à 100°C pendant 5 minutes. Dans ces conditions, les protéines se dissocient en leurs sous-unités en fixant de grandes quantités de détergent (environ 1,4 g de détergent par gramme de protéine), ce qui masque complètement la charge naturelle de la sous-unité protéique et lui confère une charge nette négative. Plus les molécules sont volumineuses, plus la charge en SDS est importante, ce qui signifie que la mobilité électrophorétique d'une molécule dépend de sa masse moléculaire. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des enzymes commerciales a été réalisée à l'aide du système Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Biosciences, San Francisco, USA) sur des plaques en verre (18 × 16 cm) et de 1,5 mm d'épaisseur de gel. Les gels de séparation et de

concentration (10% et 5%) sont préparés dans le tampon tris-HCl contenant du SDS à pH 8,8 et pH 6,8 respectivement. La migration est faite à 10°C sous ampérage constant de 100 mA et une tension de 500 V pendant 2 heures dans le tampon de migration Tris (25 mM)/glycine (192 mM) contenant du SDS (0,1%, m/v). Des marqueurs de masses moléculaires connues (S8445 Sigma) sont utilisés comme protéines de référence. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie R-250, (0,1%, m/v) ; solution contenant de l'éthanol (25%, v/v) et de l'acide acétique (8%, v/v). La décoloration a été réalisée par lavages successifs dans le mélange méthanol/acide acétique/eau (100/25/200 et 480/60/480, v/v/v).

II.2.3. Hydrolyse des pectines et méthodes de caractérisation

II.2.3.1. Production de POS par voie enzymatique

II.2.3.1.1. Hydrolyse de l'acide polygalacturonique

La production de POS à partir de l'acide polygalacturonique a été réalisée en utilisant individuellement toutes les enzymes sauf le Rapidase Smart. Pour toutes ces enzymes, l'hydrolyse est effectuée comme suit: 50 ml d'une solution d'acide polygalacturonique à 0,2% (P/V) dans un tampon acétate 0,1 M sont placés sous agitation et équilibrés aux conditions de l'enzyme (cf. paragraphe II.1.3). 50 ml d'enzyme (dilués 1/3000) équilibrés à température et pH sont ajoutés au substrat, le tout est maintenu sous agitation. Des aliquotes sont prélevées à différents temps pendant 2 heures. Après inactivation de l'enzyme à 100°C sur une durée de 10 minutes, suivie d'un refroidissement, les aliquotes sont filtrées sur un filtre nylon (Acrodisc®) de 0,45 µm puis congelées avant analyse.

II.2.3.1.2. Hydrolyse de la pectine de betterave

La production de POS à partir de la pectine de betterave a été réalisée en combinant l'Endopolygalacturonase M2 et la Rapidase Smart®. 100 ml d'une solution de pectine de betterave 0,5% (P/V) ajustée à pH 5,5 et préchauffée à 40°C, est hydrolysée par 20 µl de chaque solution d'enzyme ajoutée. Le suivi cinétique de la réaction est réalisé en effectuant des prélèvements à différents temps suivis par l'inactivation de l'enzyme à 100°C pendant 10

minutes. Après refroidissement, les aliquotes sont filtrées sur un filtre de 0,45 µm, mises en vial puis congelées avant analyse.

Des volumes importants pour les hydrolysats de 2, 5 et 15 minutes ont été réalisés. Ces hydrolysats sont concentrés au rotavapor (R-210 Büchi), congelés puis lyophilisés. Les poudres obtenues sont conservées à température ambiante dans un dessiccateur pour les analyses futures.

II.2.3.2. Production de POS par voie thermique

II.2.3.2.1. Autohydrolyse de l'acide polygalacturonique

Cette méthode consiste à hydrolyser le polysaccharide en utilisant sa propre acidité, due aux groupements carboxyliques du polysaccharide. Le protocole utilisé a été adapté de Bonnin *et al.*, 2008. Une solution d'acide polygalacturonique (5 g dans 500 ml) est placée à l'étuve à 100°C pendant 24 heures. Après hydrolyse, la solution est concentrée au Rotavapor jusqu'à un volume final de 150 ml. Trois volumes d'éthanol à 64% sont ajoutés et le milieu est placé à 4°C pendant une heure. Après centrifugation et évaporation de l'éthanol, le surnageant est dialysé pendant 2 heures, congelé puis lyophilisé.

II.2.3.2.2. Production de POS par traitement thermique micro-ondes de solutions de pectine de betterave

- Protocole de production de POS au four à micro-ondes

La production de POS à partir de la pectine de betterave a été réalisée dans un réacteur micro-ondes de laboratoire (modèle Start Synth, Milestone Srl, Sorisole, Italie) à une puissance maximale de 1000 W, une fréquence de 2,45 GHz, sous agitation magnétique (valeur de 80%) et 5 minutes de ventilation post traitement. Une rampe de chauffage est appliquée avec une vitesse de 20°C/min. Chaque essai d'hydrolyse est réalisé comme suit : 30 ml de solution de pectine de betterave (0,5% p/v) ajustés au pH de 3, 5 ou 7, sont prélevés et mis dans un tube hermétique de 50 mL en téflon équipé d'une sonde de température en fibre optique permettant de mesurer et de contrôler la température à l'intérieur du tube. Le tube est placé dans le réacteur micro-ondes puis chauffé à la température désirée (140, 160 ou 180°C) pendant 5, 10

ou 15 minutes. Après la fin du programme, le produit est immédiatement refroidi dans un bain de glace puis le pH est mesuré. Le produit est enfin filtré sur un filtre nylon de 0,45 µm et stocké à -22°C avant analyse.

II.2.3.2.2.1. Facteur de sévérité

Les effets de la température, du temps et du pH sur l'autohydrolyse de la pectine de betterave sont interprétés en termes de facteur de sévérité combiné ($\text{Log}R'_0$). Le facteur de sévérité combiné est un paramètre qui combine les effets des trois facteurs physiques utilisés en une équation plus simplifiée. Il est utilisé pour exprimer la sévérité du traitement et pour donner une interprétation des effets mesurés. Il est défini comme :

$$R'_0 = 10^{-pH} \times \left(t \times \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) \right) \quad (\text{Eq. 9})$$

ou

$$\text{Log}R'_0 = \text{Log}_{10}\left(t \times \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) \right) - pH \quad (\text{Eq. 10})$$

avec t = temps de la réaction en min, T = température de la réaction en °C, 100 = température de référence et 14,75 une constante liée à l'énergie d'activation de la réaction (Pedersen et Meyer, 2010).

II.2.3.2.2.2. Plan expérimental

Un plan expérimental a été utilisé dans cette étude dans le but de déterminer les conditions optimales pour lesquelles la production de POS est maximale avec un faible pourcentage d'acide galacturonique libre. Il s'agit d'un plan de type Box-Behnken à trois facteurs. Le modèle de Box-Behnken à trois facteurs est construit sur un cube. Les points expérimentaux sont placés non pas au sommet du cube mais au milieu des arêtes. Cette disposition permet de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude. Ce modèle comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point central. Dans

la pratique, on réalise 3 ou 4 points au centre. Le modèle de Box-Behnken à trois facteurs est illustré par la figure 9 ci-dessous.

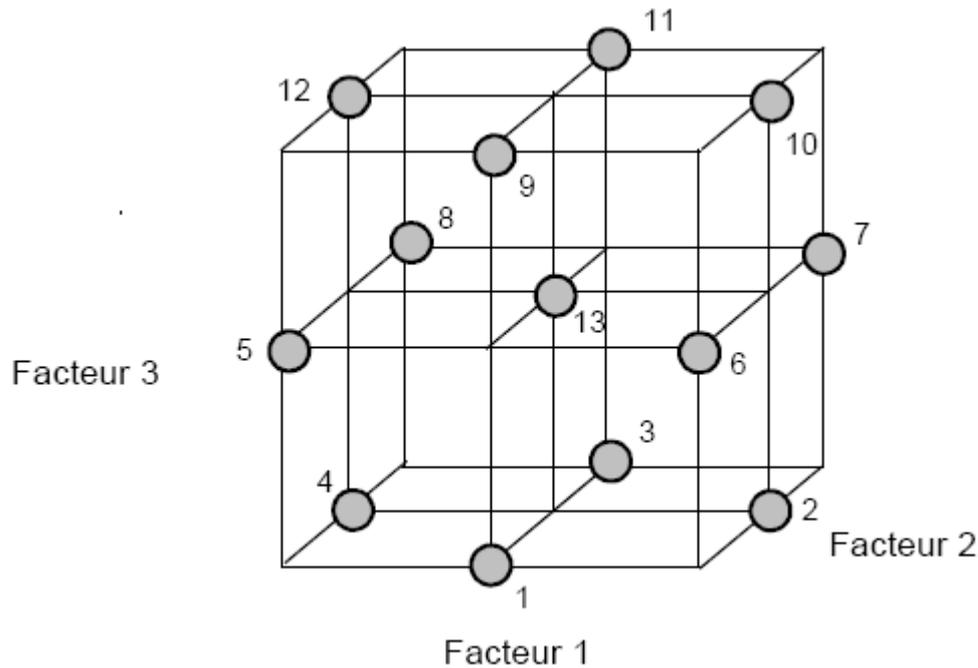


Figure 9: Représentation schématique du modèle Box-Behnken à trois facteurs (Goupy, 2006).

Cette approche devrait nous permettre d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences et en plus d'offrir une représentation mathématique des résultats expérimentaux. Les trois facteurs dont l'incidence est étudiée sur la production de POS et d'acide galacturonique sont : la température, le pH et le temps de réaction. Les facteurs et les niveaux respectifs auxquels les expériences ont été effectuées sont indiqués dans le tableau 8. Les niveaux (-1, 0 et 1) correspondent respectivement aux niveaux bas, moyen et haut de chacun des facteurs.

Tableau 8: Niveaux des variables codées

Facteurs	Niveaux		
	-1	0	1
X1 : Température (°C)	140	160	180
X2 : Temps (min)	5	10	15
X3 : pH	3	5	7

Ce plan permet d'évaluer non seulement les effets linéaires mais aussi les effets quadratiques ainsi que les effets d'interaction entre les différents facteurs. Un total de 15 essais avec 3 points centraux a été effectué dans un ordre totalement aléatoire en combinant ces trois variables. La matrice d'expérience est indiquée dans le tableau 9.

Tableau 9 : Matrice d'expérience pour la production de POS

Expériences	Température (°C)	Temps (min)	pH
E1	160	10	5
E2	140	5	5
E3	180	5	5
E4	140	15	5
E5	180	15	5
E6	140	10	3
E7	180	10	3
E8	160	10	5
E9	140	10	7
E10	180	10	7
E11	160	5	3
E12	160	15	3
E13	160	5	7
E14	160	15	7
E15	160	10	5

La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) via le logiciel Statgraphics Plus version 5.1 (Statistical Graphics Corp.) a été employée pour déterminer l'effet des trois facteurs sur la production de POS et d'acide galacturonique.

II.2.3.3. Méthodes d'analyse et de caractérisation des hydrolysats

II.2.3.3.1. Estimation de la masse moléculaire

La méthode HPSEC décrite au paragraphe II.2.1.6 a été utilisée pour estimer la masse moléculaire.

II.2.3.3.2. Analyse de la composition en oligosaccharides des hydrolysats

La technique HPAEC-PAD décrite au paragraphe II.2.1.3 a été utilisée pour la détermination du degré de polymérisation. Les conditions d'élution pour la séparation des différents DP de l'acide galacturonique sont résumées dans le tableau 10.

Seuls les standards des acides mono-, di- et trigalacturonique sont testés. Les autres degrés de polymérisation n'étant pas disponibles sur le marché, notre étude s'est limitée à la quantification des trois premiers.

Tableau 10 : Programme d'élution avec A (NaOH 100 mM), B (NaOH 100 mM + acétate de sodium 600 mM) et C (NaOH 500 mM)

Temps d'élution (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Etape de la programmation
0	95	5	0	Conditionnement
5	95	5	0	Conditionnement
10	50	50	0	Elution
15	20	80	0	Elution
35	20	80	0	Elution
36	0	50	50	Lavage
43	0	50	50	Lavage
44	95	5	0	Conditionnement
50	95	5	0	Conditionnement

II.2.3.3.3. Dosage du 5-hydroxymethyl furfural (HMF) et du 2-furaldéhyde (2-F)

Le contenu en produits de dégradation que sont le HMF et le 2-F des hydrolysats obtenus par traitement aux micro-ondes (paragraphe II.2.3.2.2) a été déterminé. Des aliquotes sont prélevées puis filtrées sur un filtre nylon-seringue de 0,45 μm . L'analyse est réalisée par HPLC (Waters 2690 alliance) équipé d'une colonne en phase inversée Agilent zorbax 300SB-C18 (150 mm \times 4,6 mm ID, 5 μm). La séparation est suivie par un détecteur UV (Waters 996 Photodiode Array Detector). L'élution est réalisée en mode isocratique avec une solution aqueuse contenant 10% de méthanol et 1% d'acide acétique à un débit de 1 ml/min. La température de la colonne est maintenue à 30°C et le volume d'injection est de 20 μl . Ces produits de dégradation sont détectés à 210 nm. Une gamme étalon d'HMF et 2-F de pureté 99% est réalisée dans les mêmes conditions.

II.2.3.3.4. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse thermogravimétrique (ATG) couplée à la spectroscopie infrarouge (IR) permet d'étudier simultanément les pertes de masse et les produits de décomposition des échantillons soumis à une certaine température, sous atmosphère contrôlée. La spectroscopie infrarouge permet d'analyser des fonctions chimiques par la détection des vibrations caractéristiques aux liaisons chimiques résultant de l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Lorsque la longueur d'onde apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière absorbe le rayonnement et une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise est enregistrée. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2,5–25 μm) correspond au domaine d'énergie de vibration des liaisons chimiques des molécules organiques.

Le couplage ATG-IRTF est réalisé grâce à une interface qui relie l'analyseur thermogravimétrique TGA/SDTA 851e (Mettler Toledo, Switzerland) au spectromètre IRTF Nicolet Nexus 870 (Société ThermoElectron) muni d'un analyseur de produits volatils. Les gaz émis poussés par le gaz de balayage, sont dirigés vers une cellule à gaz infrarouge, placée dans une enceinte chauffée qui les guidera jusqu'au spectromètre où les spectres IRTF sont collectés (Figure 10). Les expériences ont été réalisées sous flux d'azote de 50 ml/min. Les masses d'échantillon d'environ 6 mg ont été chauffées de 25 à 600°C à une vitesse de chauffage de 5°C/min.

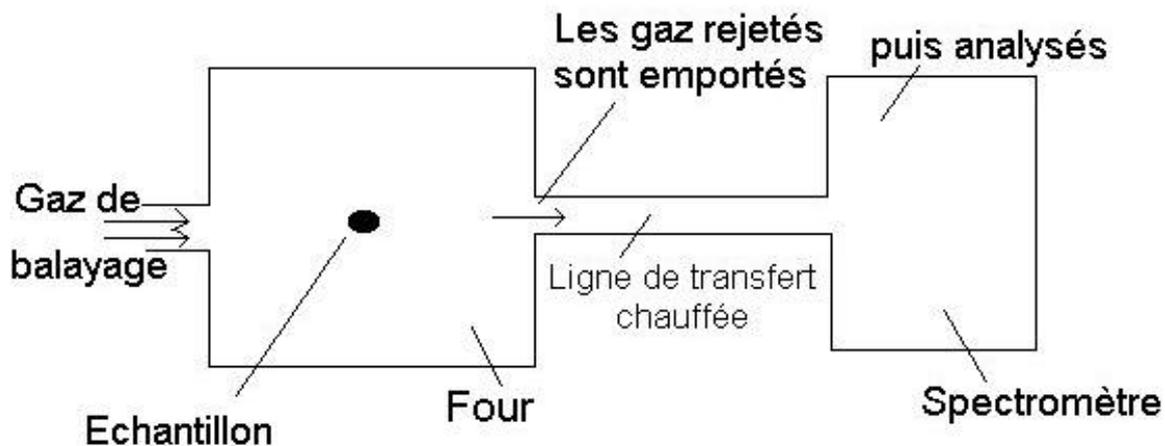


Figure 10: Représentation schématique du couplage ATG/IRTF

II.2.3.3.5. Analyse calorimétrique différentielle

L'analyse calorimétrique différentielle (ACD) est une méthode thermoanalytique qui permet de mesurer les propriétés physiques (température de transition vitreuse, l'enthalpie des changements d'état) d'un échantillon soumis à un traitement thermique. Elle est basée sur l'étude de l'énergie dégagée ou absorbée par le matériau quand il subit des transformations physiques ou chimiques lors d'un cycle thermique. D'une manière générale, les transitions de phase et l'évaporation de solvants se traduisent par des pics endothermiques. En revanche, la cristallisation, l'oxydation et certaines réactions de décomposition se caractérisent par des pics exothermiques. Cette méthode consiste à chauffer progressivement à vitesse constante l'échantillon (capsule contenant l'échantillon) à analyser et une référence inerte (capsule vide) de même masse, dans le domaine de températures étudié. A chaque instant, la différence de flux thermique nécessaire pour maintenir l'échantillon et la référence à la même température est mesurée. Un étalonnage permet de convertir cette mesure en flux de chaleur différentiel.

- Protocole

Les analyses par ACD ont été menées au laboratoire de l'unité de chimie et de physiques des hauts polymères de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve. Elles ont été effectuées à l'aide d'un appareil DSC, (Mettler Toledo 821e., CT, Suisse). L'échantillon, d'environ 6 mg,

est placé dans une capsule en aluminium avec le couvercle perforé et une capsule vide de même poids qui sert de référence. Elles sont ensuite placées dans le four de l'appareil. Les échantillons sont d'abord stabilisés pendant 5 min à 25°C puis chauffés de 25 à 400°C à une vitesse de 5°C/min. Les analyses ont été effectuées en double.

II.2.3.3.6. Diffraction des rayons X

La technique de diffraction des rayons X consiste à faire interagir un faisceau monochromatique de rayon X de longueur d'onde λ avec un réseau cristallin caractérisé par des distances réticulaires (d). Le rayonnement pénètre le cristal. Une partie de l'énergie est absorbée et l'autre partie excite les atomes de la structure. Les radiations émises partent dans toutes les directions de l'espace. Ainsi, la loi de Bragg montre qu'à chaque famille de plans réticulaires, un rayon diffracté y est associé de sorte que :

$$2 d \sin (\theta) = n \lambda$$

(Eq. 11)

où θ est l'angle entre le rayon incident et le plan de diffraction et n un nombre entier correspondant à l'ordre de la diffraction.

● Protocole

La cristallinité des poudres d'hydrolysats obtenues au paragraphe II.2.3.1.2 a été analysée en utilisant le diffractomètre D8 Advance (Bruker, Germany) muni d'une anode en cuivre générant des radiations de longueur d'onde $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ sous une tension de 40 kV. Les diffractogrammes sont enregistrés à température ambiante dans la gamme angulaire en 2θ comprise entre 6 et 33° avec un pas de 0,02° et un temps de comptage de 5 s. Les analyses ont été effectuées en triple.

II.2.3.3.7. Analyse au microscope optique

Les échantillons obtenus au paragraphe II.2.3.1.2 ont été également analysés au microscope optique. Les observations ont été réalisées à température ambiante à l'aide du microscope

Nikon Eclipse E400 (Kanagawa, Japon) avec un grossissement de l'objectif à 50x. Ce microscope est équipé d'une caméra numérique Nikon DMX 1200, elle-même reliée à un ordinateur. Quelques milligrammes d'échantillon sous forme de poudre, montés entre lame et lamelle sont soumis à l'observation.

Le logiciel Lucia G. version 5.3 permet de récupérer les photographies des observations.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Production et caractérisation d'oligosaccharides pectiques par voie enzymatique

Les oligosaccharides et plus particulièrement les oligosaccharides pectiques issus de la dégradation des pectines sont depuis quelques années au cœur de la recherche parce qu'ils exercent des effets physiologiques particulièrement intéressants (Burana-Osot *et al.*, 2010). L'analyse de ces composés nécessite avant tout l'hydrolyse de la pectine. Dans la littérature, plusieurs méthodes sont décrites pour l'obtention des oligosaccharides. Il s'agit de traitements chimiques, physiques et enzymatiques. Mais, la voie enzymatique reste de loin la principale approche pour produire de grandes quantités d'oligosaccharides.

La complexité de la structure des pectines et la multiplicité des liaisons glycosidiques qu'il faut rompre pour libérer les oligosaccharides nécessite souvent la combinaison d'un certain nombre d'enzymes. La plupart des préparations commerciales d'enzymes pectolytiques ne sont pas pures, elles possèdent de nombreux additifs et impuretés. Elles renferment généralement plusieurs enzymes et plusieurs activités enzymatiques différentes pouvant entraîner l'hydrolyse complète de la pectine. Par conséquent, la pureté des enzymes représente un facteur important à prendre en compte dans la production de POS.

Dans ce contexte, l'objectif de produire des oligosaccharides pectiques ne sera atteint qu'en optimisant le choix des enzymes. Plusieurs préparations commerciales de pectinases ont été testées à cet effet. Nous avons d'une part, caractérisé ces pectinases en termes d'activité spécifique polygalacturonase (endo et exo) et de pureté en les testant sur une pectine modèle pour mieux cerner l'efficacité de chacune dans la production de POS et d'autre part déterminé la combinaison d'enzymes à utiliser pour hydrolyser une pectine plus complexe, la pectine de betterave.

III.1.1. Production de POS à partir d'une pectine modèle (acide polygalacturonique) à l'aide de pectinases commerciales

III.1.1.1. Comparaison des enzymes et contrôle des activités

Afin de normaliser les essais d'hydrolyse, nous avons mesuré l'activité et contrôlé la pureté des différentes préparations commerciales. Parmi ces différentes préparations commerciales utilisées, il s'est avéré nécessaire pour une de ces enzymes, la Pectinase P-4716 de déterminer la température et le pH qui n'ont pas été précisés par le fournisseur.

III.1.1.1.1. pH optimum d'action et stabilité au pH de la Pectinase P-4716

La détermination du pH optimum d'hydrolyse de la pectine par la Pectinase P-4716 a été réalisée dans une gamme de pH comprise entre 3 à 5 à 40°C pendant 10 minutes. L'examen de la figure 11 montre que l'optimum d'activité se situe à pH 3,8.

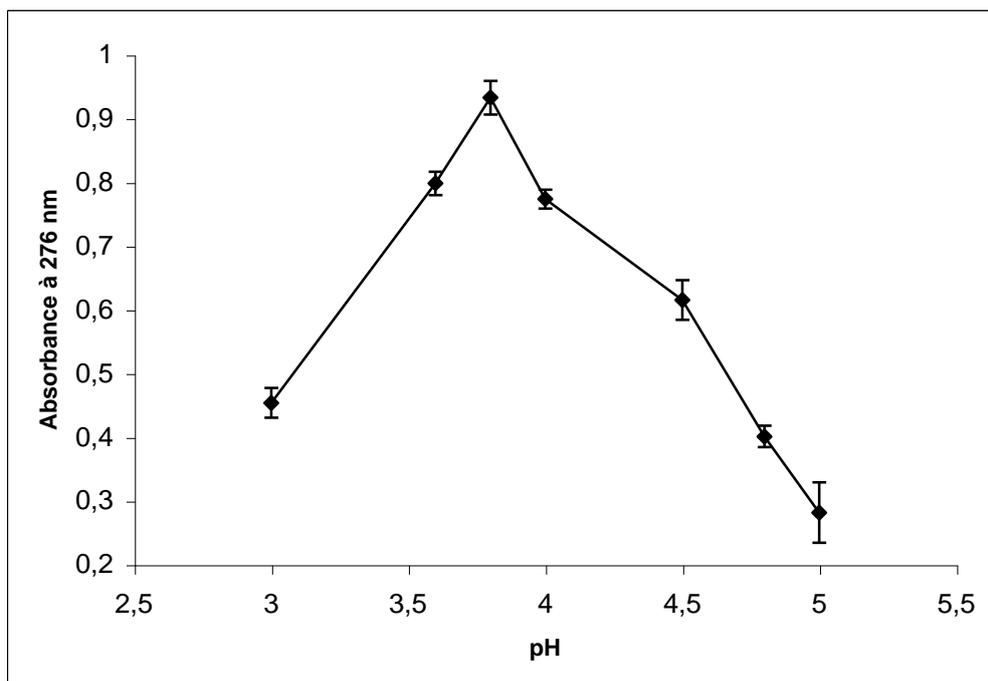


Figure 11: pH optimum d'hydrolyse de la pectine de citron par la Pectinase P-4716 à 40°C (moyenne de 2 répétitions).

La valeur optimale de pH de la Pectinase P-4716 se situe bien dans la gamme des pH optimum des pectinases acides d'origine fongique dont les valeurs varient entre 3,0 et 5,5 (Kashyap et *al.*, 2001; Jayani et *al.*, 2005). En effet, divers microorganismes produisent des

pectinases actives à pH acide. Par exemple *Aspergillus niger* CH4, *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon psychrophile *Mucor flavus* synthétisent des pectinases actives à pH compris entre 3,5 et 6,0, entre 3 et 5,5 et entre 3,5 et 5,5 respectivement (Acuna-Arguelles et al., 1995; Gainvors et al., 2000 ; Gadre et al., 2003).

L'effet du pH sur la stabilité de la Pectinase P-4716 a été étudié sur une gamme de pH comprise entre 3 et 5 à 40°C pendant 10 minutes. Les échantillons enzymatiques ont d'abord été conservés à 4°C pendant 24 heures aux différents pH avant utilisation. La stabilité aux pH mesurée en utilisant les activités résiduelles obtenues par rapport aux activités initiales aux différents pH et exprimée en pourcentage (Figure 12) montre que la Pectinase P-4716 est très stable à son pH optimum de 3,8 et conserve 97% de son activité. Cependant, aux pH 3, 3,6 et 4 l'enzyme conserve respectivement 94, 95 et 90% de son activité. Par contre, des pertes d'activités de 13 et 25% (soit en dessous de 90%) sont observées aux pH moins acides respectivement 4,5 et 5.

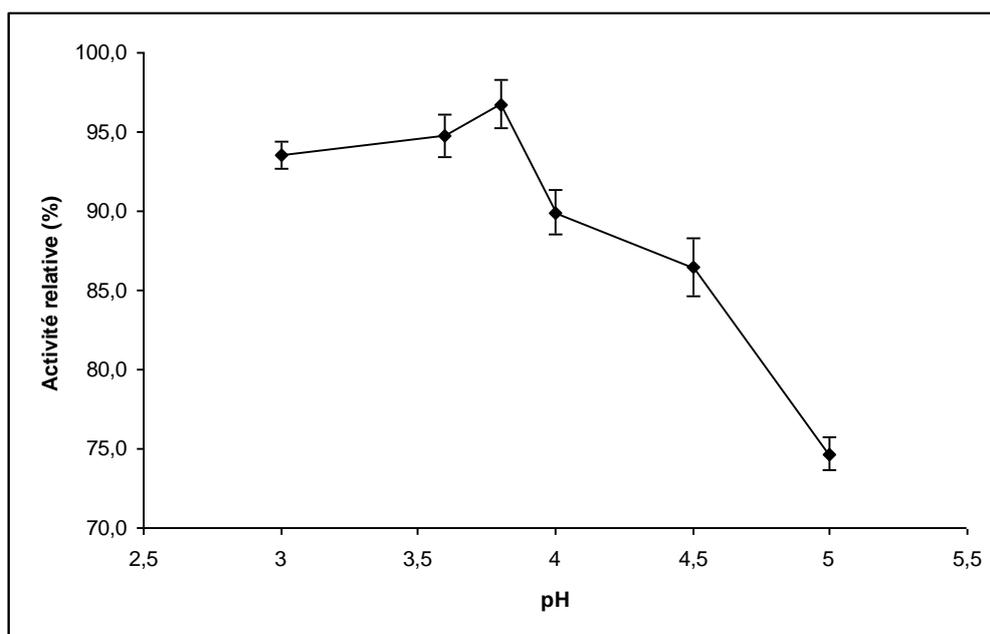


Figure 12: pH de stabilité d'hydrolyse de la pectine de citron par la Pectinase P-4716 à 40°C (moyenne de 2 répétitions).

III.1.1.1.2. Température optimale d'action et stabilité à la température de la Pectinase P-4716

La température optimale d'hydrolyse de la pectine par la Pectinase P-4716 a été déterminée en soumettant les milieux réactionnels à des températures variant de 20 à 70°C à pH 3,8

pendant 10 minutes. La courbe d'activité de la Pectinase P-4716 en fonction de la température est représentée sur la figure 13. La température optimale d'hydrolyse de la pectine est située autour de 60°C. Cet optimum est supérieur aux valeurs de température optimale (jusque 50°C) généralement obtenues avec les pectinases acides produites par des champignons. Néanmoins, certaines espèces telles qu'*Aspergillus aculeatus*, *Fusarium oxysporum* et *Thermoascus aurianticus* produisent des pectinases avec une activité optimale de température allant de 60 à 65°C (Foda *et al.*, 1984 ; Vazquez *et al.*, 1993 ; Martins *et al.*, 2002).

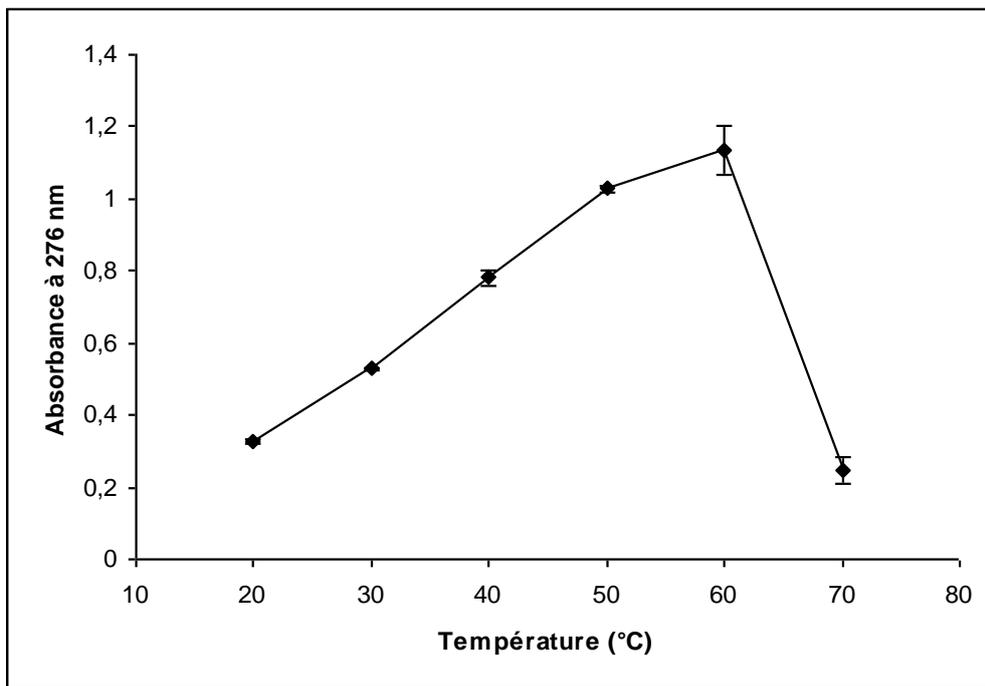


Figure 13: Température optimale d'hydrolyse de la pectine de citron par la Pectinase P-4716 à pH 3,8 (moyenne de 2 répétitions).

La thermostabilité d'une enzyme est définie comme sa capacité à résister à la chaleur en l'absence de substrats. La thermostabilité de la Pectinase P-4716 a été déterminée en soumettant les échantillons enzymatiques à des températures variant de 20 à 70°C pendant 10 minutes. Après traitement aux différentes températures et refroidissement à température ambiante, la température de stabilité d'hydrolyse de la pectine de citron par la Pectinase P-4716 a été déterminée sur la gamme de température décrite précédemment à 40°C pendant 10 minutes. La stabilité thermique est mesurée en utilisant les activités résiduelles de l'enzyme par rapport aux activités initiales aux différentes températures et exprimée en pourcentage. La figure 14 montre que la Pectinase P-4716 présente une bonne stabilité thermique dans une

gamme de température comprise entre 30 et 50°C avec en moyenne 9 à 11% de pertes d'activités. Aux températures extrêmes, des pertes d'activités de l'ordre de 23 et 59% sont observées respectivement à 20 et 60°C. On note cependant une inactivation de l'enzyme à partir de 70°C.

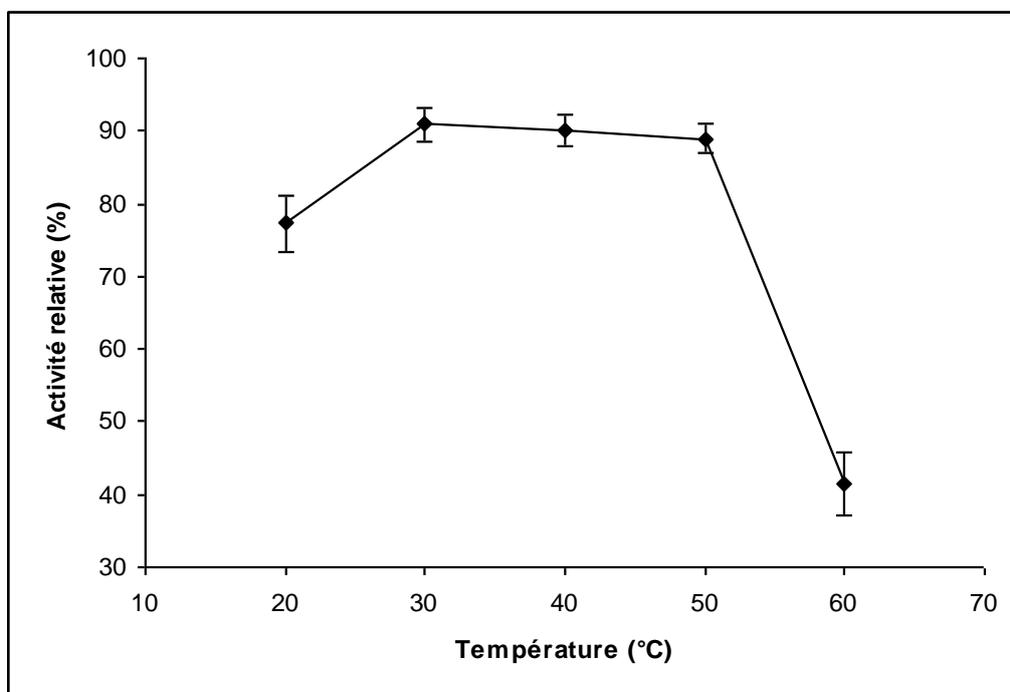


Figure 14: Température de stabilité d'hydrolyse de la pectine de citron par la Pectinase P-4716 à pH 3,8 (moyenne de 2 répétitions).

III.1.1.1.3. Mesure des activités des pectinases commerciales utilisées

III.1.1.1.3.1. Activité exo-polygalacturonase (exo-PG)

La méthode par dosage de groupes réducteurs est la plus fréquente pour déterminer l'activité exo-PG. Le dosage des groupes réducteurs est réalisé par des méthodes colorimétriques. Différentes méthodes existent dans la littérature, entre autres la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959), la méthode au réactif de cuivre-arsénomolybdate de Somogyi et Nelson (Somogyi, 1960) et la méthode au cyano-2-acétamide (Baron *et al.*, 1988). Les premiers essais de dosage de l'activité exo-PG ont été réalisés avec la méthode DNS. C'est une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre. Mais il s'est avéré que cette méthode présente un certain nombre de contraintes. Elle est peu répétable et la formation de

précipité est souvent observée au cours du mélange des réactifs. Face à cela, la méthode au cyano-2-acétamide a été testée. Elle découle de celle de Verlent *et al.* (2005) et elle est également simple, rapide, et demande très peu de réactifs. Cette méthode au cyano-2-acétamide est répétable et donc elle a été retenue pour la suite de nos travaux.

Dans un premier temps, une droite de calibration a été établie en portant l'absorbance à 276 nm en fonction de la quantité croissante d'acide galacturonique, principal constituant des pectines. La figure 15 représente la droite obtenue lors du dosage de l'acide galacturonique par la méthode au cyano-2-acétamide.

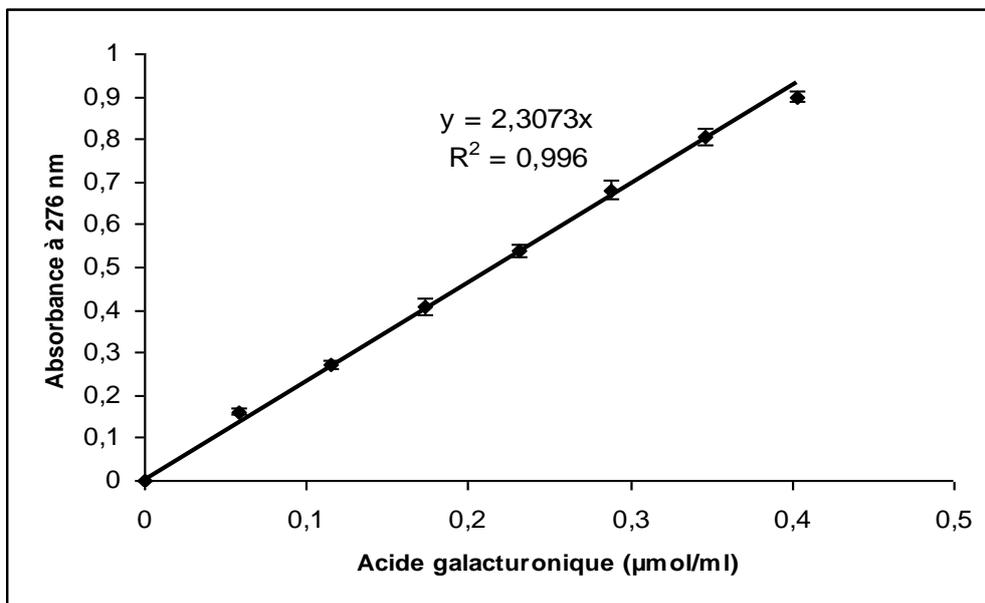


Figure 15: Dosage de l'acide galacturonique par la méthode au cyano-2-acétamide: relation entre l'absorbance à 276 nm et la concentration en acide galacturonique (moyenne de 3 répétitions).

Les résultats montrent une augmentation linéaire de l'absorbance (coefficient de corrélation est de 0,99) en fonction de la quantité d'acide galacturonique, conséquence de la capacité réductrice de celui-ci en présence du réactif.

L'activité exo-PG est définie comme la quantité d'enzymes nécessaire à la libération d'une micromole de groupes réducteurs équivalent acide galacturonique par unité de volume enzymatique et par unité de temps.

III.1.1.1.3.2. Activité endo-polygalacturonase (endo-PG)

L'endo-PG hydrolyse les liaisons α -(1-4) entre deux acides galacturoniques non estérifiés. Son action entraîne une forte diminution de la viscosité du milieu. L'activité endo-PG est déterminée sur base de la mesure de la diminution de la viscosité d'une solution de pectine.

A part la Rapidase Smart®, les six autres pectinases ont été évaluées en termes de réduction de la viscosité d'une solution de pectine de citron pour estimer leur activité endo-PG. La pectine de citron a dans ce cas été utilisée car commerciale et plus largement disponible. Les résultats obtenus sont représentés à la figure 16.

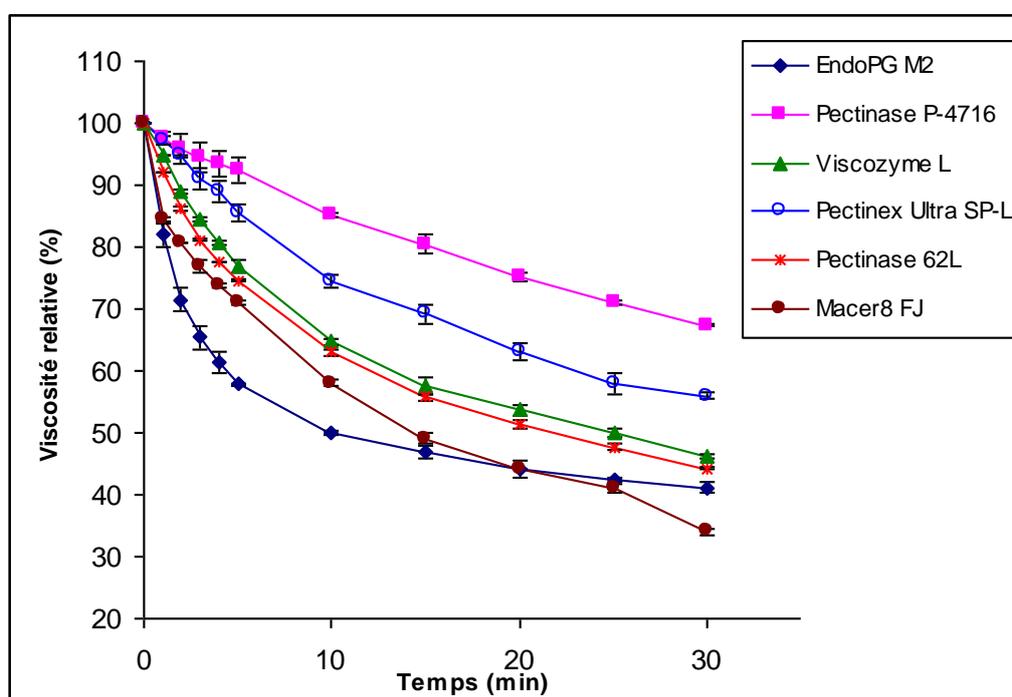


Figure 16: Evolution de la viscosité au cours du temps d'une solution de pectine en présence des différentes préparations enzymatiques commerciales (moyenne de 2 répétitions).

L'analyse de ces résultats montre que toutes ces pectinases sont actives sur le substrat pectique. Elles provoquent une diminution de la viscosité de la pectine de citron. Par ailleurs certaines pectinases semblent être plus actives que d'autres. Ainsi, les préparations commerciales comme EndoPG-M2 et Macer8 FJ présentent des activités dépolymérisantes élevées avec des diminutions de la viscosité à 50% atteintes à environ 10 et 15 minutes respectivement.

III.1.1.1.3.3. Bilan de l'ensemble des activités mesurées

L'ensemble des activités mesurées sur les différentes pectinases commerciales est résumé dans le tableau 11. L'activité endo-PG de toutes ces pectinases a été calculée sur base de la formule décrite au paragraphe II.2.2.2.3.2.

Tableau 11: Comparaison des activités PG mesurées pour les pectinases commerciales (résultats de 2 répétitions).

Préparations commerciales	Protéines (mg/ml)	Activités (U/ml)		Activités (U)	
		Exo-PG	Endo-PG	Exo-PG	Endo-PG
EPG-M2	0,2±0,0	295,6±7,6	47774±7900	4,9	796,2
Pectinase P-4716	15,5±0,5	264,7±4,6	3160±757	4,4	52,7
Viscozyme L	24,3±1,8	415,4±7,3	11725±500	6,9	195,4
Pectinex Ultra SP-L	11,8±0,8	523,8±6,6	7161±1702	8,7	119,3
Pectinase 62L	17,4±0,2	561,5±4,1	15538±442	9,4	258,9
Macer8 FJ	12,8±1,1	459,4±3,1	24125±000*	7,7	402,1

* : pente identique trouvée sur deux répétitions

Comme on peut le remarquer, il existe des différences entre les préparations de pectinases. Les préparations Pectinase 62L, Pectinex Ultra SP-L, Macer8 FJ et Viscozyme L présentent une activité exo-polygalacturonase plus élevée que celle de l'EPG-M2 et de la Pectinase P-4716. L'activité endo-polygalacturonase de l'EPG-M2 est 2 à 15 fois supérieure à celles des autres préparations de pectinases.

III.1.1.1.4. Profil électrophorétique des différentes pectinases sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Afin d'évaluer le degré de pureté des pectinases commerciales utilisées, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été réalisée. Des marqueurs de poids moléculaires connus (S8445 Sigma) sont utilisés comme protéines de référence (Figure 17). La figure 17 montre que le taux de protéines contaminantes est très important dans les solutions enzymatiques commerciales à l'exception de l'EPG-M2 et justifie la plus faible teneur en protéines mesurée pour cette enzyme (Tableau 11). Ces contaminants témoignent de l'hétérogénéité des préparations commerciales. La préparation EPG-M2 issue d'*Aspergillus aculeatus*, présente un degré de pureté élevé caractérisé par la bande protéique majoritaire de

masse moléculaire estimée à environ 41 kDa en accord avec les observations de Benen *et al.* (1999) et de Prasanna *et al.* (2006).

La bande de protéines à 41 kDa est également présente en quantité importante dans trois autres préparations commerciales (Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L et Pectinase 62L). Cela ne signifie pas que les deux autres préparations (Pectinase P-4716 et Macer8 FJ) ne contiennent pas d'activité endo-polygalacturonase, car des masses moléculaires plus ou moins élevées que 41 kDa ont été rapportés dans la littérature pour des endo-polygalacturonases (De Vries et Visser, 2001; Contrevas Esquivel et Voget, 2004). L'hétérogénéité des préparations enzymatiques commerciales testées rend difficile la détection de l'activité polygalacturonase ou endopolygalacturonase en raison de l'action synergique des activités. Les différentes activités dans les préparations enzymatiques commerciales peuvent en effet interférer sur la détermination des activités endo et exopolygalacturonase.

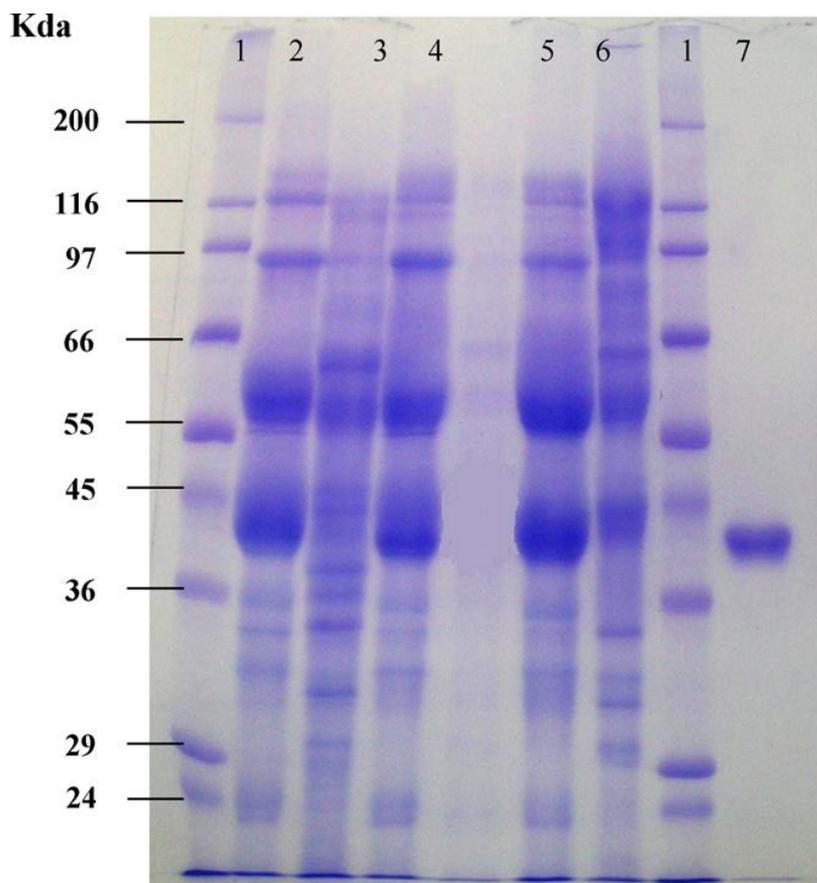


Figure 17: Electrophorèse des différentes préparations commerciales utilisées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. (1) marqueurs de poids moléculaires connus; (2) Viscozyme L ; (3) Pectinase P-4716; (4) Pectinex Ultra SP-L; (5) Pectinase 62L; (6) Macer8 FJ; (7) Endopolygalacturonase M2.

III.1.1.2. Hydrolyse de l'acide polygalacturonique et caractérisation des produits d'hydrolyse

Les six pectinases commerciales décrites précédemment ont été mises en œuvre individuellement pour hydrolyser l'acide polygalacturonique. Les essais d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique sont réalisés dans les conditions expérimentales décrites au paragraphe II.2.3.1.1. La cinétique de dépolymérisation de l'acide polygalacturonique par ces préparations commerciales a été réalisée en caractérisant la libération des oligogalacturonides. Le dosage des oligogalacturonides est assuré par chromatographie échangeuse d'anions couplée au détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD) suivant les conditions décrites au paragraphe II.2.3.3.2.

III.1.1.2.1. Analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec un détecteur ampérométrique

Afin d'identifier les fragments libérés dans le mélange réactionnel, les hydrolysats ont été analysés par HPAEC-PAD. Les produits d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique ont été identifiés sur base du temps de rétention d'une préparation d'oligogalacturonides de degré de polymérisation (DP) 1 à 10 représentés à la figure 18.

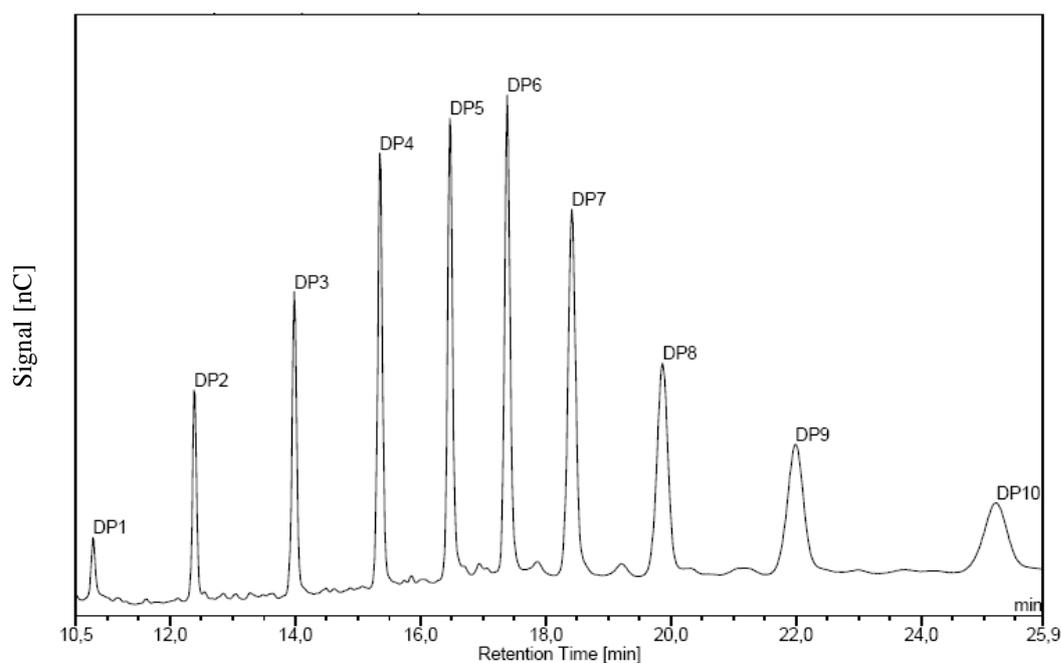


Figure 18: Profil chromatographique d'un mélange standard d'oligogalacturonides de différents DP.

Les profils d'élution des produits de dégradation de l'acide polygalacturonique par les différentes pectinases commerciales sont illustrés par les figures 19, 20 et 21.

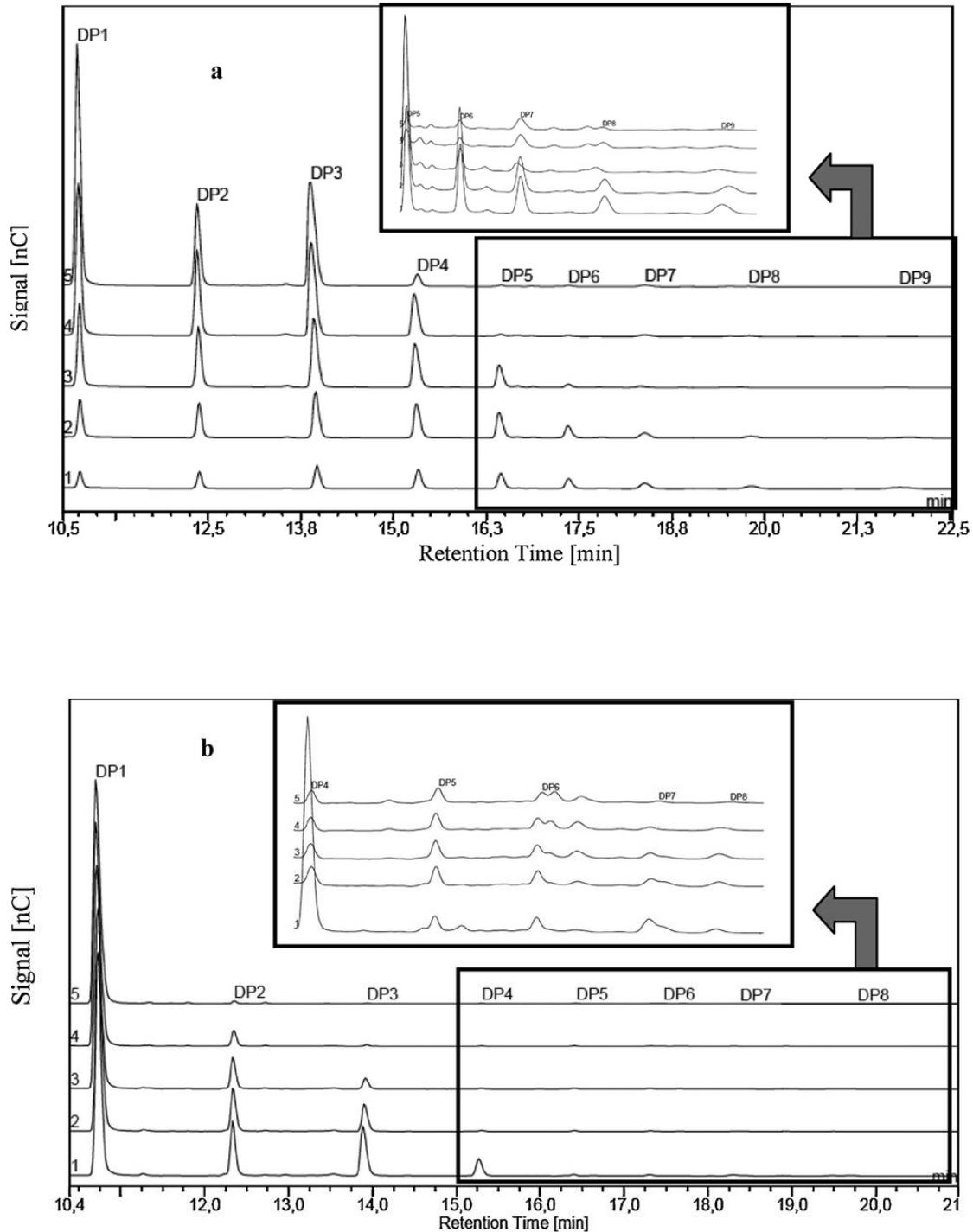


Figure 19: Chromatogrammes des oligogalacturonides libérés par action des pectinases commerciales sur l'acide polygalacturonique à différents temps d'incubation: (1) 5 min; (2) 15 min; (3) 30 min; (4) 60 min; (5) 120 min. (a) endopolygalacturonase M2 ; (b) Viscozyme L.

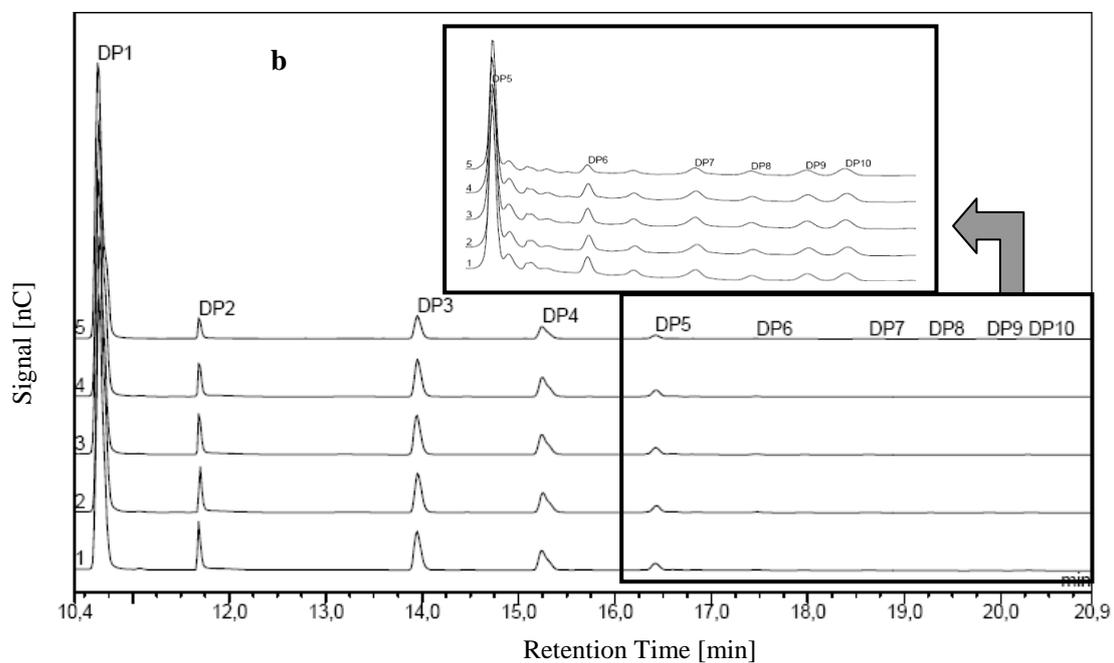
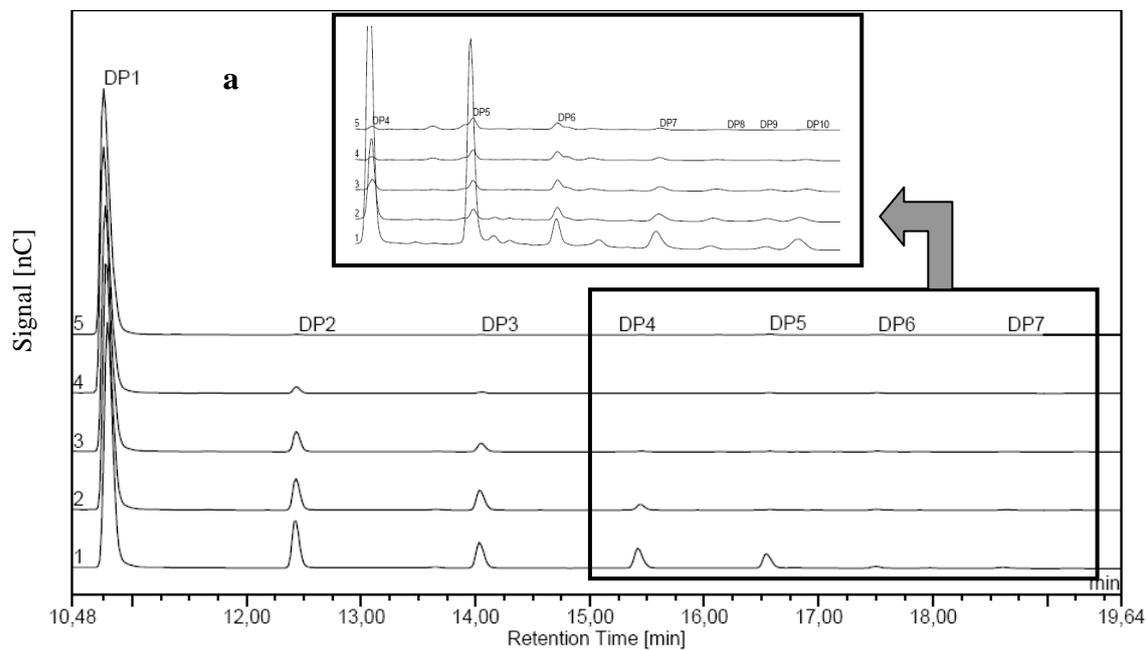


Figure 20: Chromatogrammes des oligogalacturonides libérés par action des pectinases commerciales sur l'acide polygalacturonique à différents temps d'incubation: (1) 5 min; (2) 15 min; (3) 30 min; (4) 60 min; (5) 120 min. (a) Pectinase P-4716; (b) Pectinex Ultra SP-L.

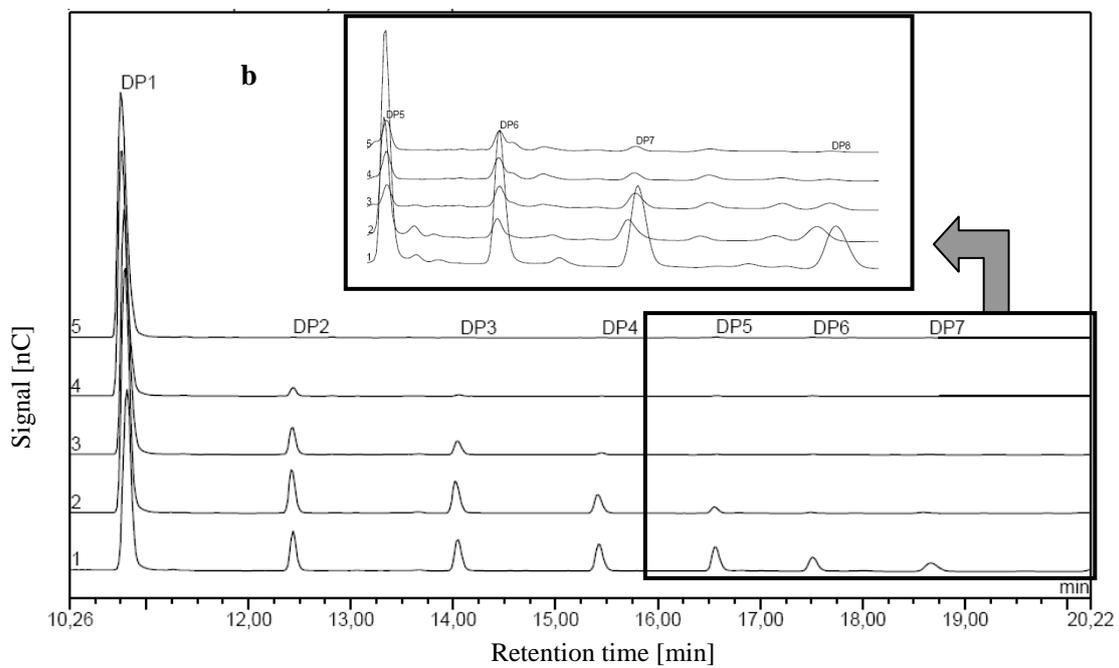
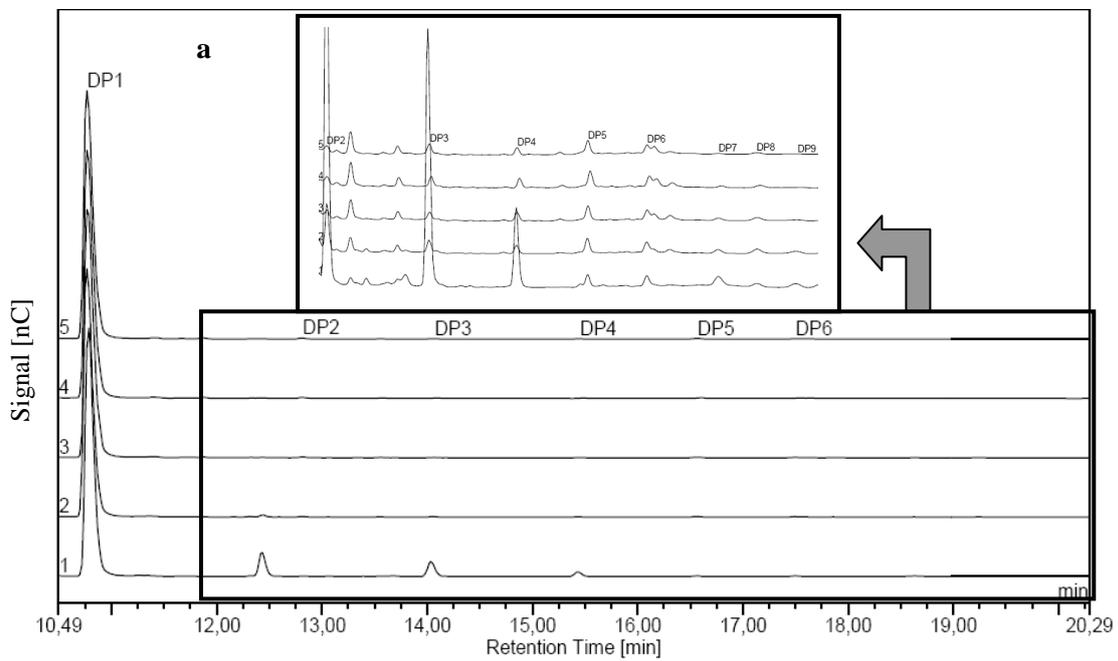


Figure 21: Chromatogrammes des oligogalacturonides libérés par action des pectinases commerciales sur l'acide polygalacturonique à différents temps d'incubation: (1) 5 min; (2) 15 min; (3) 30 min; (4) 60 min; (5) 120 min. (a) Pectinase 62L; (b) Macer8 FJ.

Les résultats (Figures 19, 20 et 21) montrent l'apparition d'un mélange d'oligogalacturonides après seulement 5 minutes d'hydrolyse. Cependant, les signaux obtenus ici ne sont pas proportionnels à la quantité de produit du milieu car la réponse au détecteur des composés baisse non linéairement avec la longueur de chaîne.

La formation rapide des oligogalacturonides dès le début de la réaction de dépolymérisation de l'acide polygalacturonique indique que ces enzymes agissent par un mécanisme de clivage aléatoire, ce qui démontre la nature endopolygalacturonase des préparations commerciales. Il est généralement admis que l'endopolygalacturonase agit de façon aléatoire sur l'acide polygalacturonique pour libérer des oligomères de longue chaîne qui sont ensuite hydrolysés en des oligomères de chaîne plus courte (Benen *et al.*, 1999). De plus la libération des DP 1 à 3 comme principaux produits par l'EPG-M2 (Figure 19a) est bien en conformité avec son activité endopolygalacturonase. Contrevas Esquivel et Voget (2004) ont abouti aux mêmes observations que les nôtres avec une endopolygalacturonase d'*Aspergillus kawachii* sur un polygalacturonate.

Par ailleurs, un changement de profil des oligogalacturonides est observé lors de l'hydrolyse prolongée de l'acide polygalacturonique. Les DP de longues chaînes sont hydrolysés en DP plus faibles. Contrairement à l'EPG-M2, les autres préparations commerciales favorisent l'accumulation du DP1 comme produit principal après 2 heures de réaction. Ceci suggère que ces enzymes ont plus d'affinité pour les oligogalacturonides ou une autre hypothèse serait la présence d'activité exopolygalacturonase (exoPG) au sein de ces préparations commerciales.

III.1.1.2.2. Quantification des oligogalacturonides

La quantification concerne les oligomères pectiques dont les standards sont disponibles sur le marché. Il s'agit du DP1, du DP2 et du DP3. A partir des solutions standards de chacun de ces oligomères, des droites de calibration ont pu être établies en mettant en relation la réponse du détecteur PAD et la concentration de chacun de ces oligomères (Figure 22).

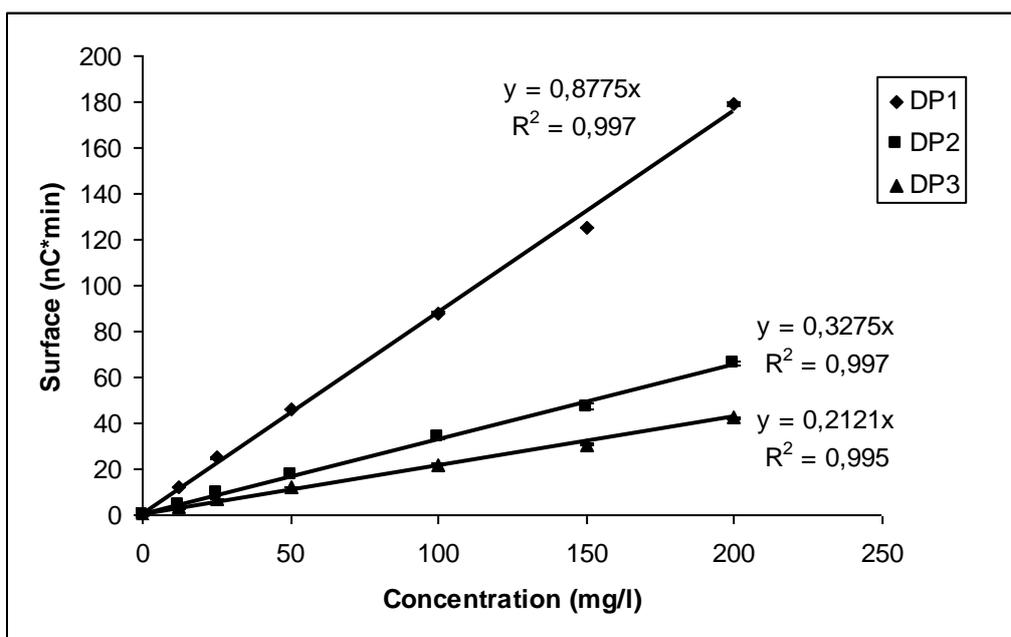


Figure 22: Droites de calibration pour les acides mono, di- et tri- galacturoniques (DP1, DP2, DP3) (moyenne de 2 répétitions).

Ces droites ont permis de faire la quantification sur base des surfaces des pics. Les concentrations obtenues pour chaque oligomère avec l'équation de ces droites ont permis de calculer le rapport de concentration AGA/DiAGA (Tableau 12). Selon Sakamoto *et al.* (2002), la présence de l'activité exoPG peut être évaluée en calculant le rapport de la concentration de l'acide galacturonique à celle du diacide galacturonique au cours de l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique. Ainsi, la préparation ayant une activité exoPG élevée présentera un rapport élevé. Sur base de ces calculs, nous pouvons affirmer que toutes les enzymes affichent une activité exoPG, excepté EPG-M2. Par conséquent, l'activité polygalacturonase dépend de l'action synergique de ces activités (exo et endo).

Tableau 12: Rapports AGA/DiAGA obtenus après hydrolyse de l'acide polygalacturonique par les différentes pectinases commerciales.

Pectinases commerciales	Rapport de concentration DP1/DP2 aux différents temps d'hydrolyse				
	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h
EPG-M2	0,23	0,25	0,31	0,44	0,71
Pectinase P-4716	1,81	2,96	4,80	15,50	197,90
Viscozyme L	1,50	1,92	2,83	6,34	43,01
Pectinex Ultra SP-L	3,85	4,50	4,60	5,10	8,74
Pectinase 62L	4,13	60,30	147,80	117,80	100,70
Macer8 FJ	1,80	2,20	3,50	12,30	222,50

L'influence des pectinases commerciales sur la concentration des acides mono, di- et tri-galacturoniques au cours du temps est présentée à la figure 23. Les concentrations obtenues avec l'équation des droites (Figure 22) sont exprimées en pourcentage de la masse du produit de départ. L'analyse de ces résultats montre que l'EPG-M2 donne de loin les teneurs les plus élevées en oligogalacturonides totaux contrairement aux autres préparations commerciales. Les teneurs maximales obtenues représentent 58% pour le triacide galacturonique, 18% pour le diacide galacturonique et 13% pour l'acide galacturonique après 2 h de réaction. Pour les autres préparations commerciales, des quantités généralement faibles en di et triacide galacturoniques sont obtenues au regard de l'acide galacturonique. Avec la Viscozyme L, la Pectinex Ultra SP-L et la Pectinase 62L, des concentrations maximales pour le DiAGA et le TriAGA sont observés dans les 5 premières minutes et sont respectivement de 9,5% et 17,5% ; 4,3% et 12,2% ; 7,6% et 8,7%. La Pectinase P-4716 et la Macer8 FJ obtiennent leur maxima après 15 min d'hydrolyse avec respectivement 9,1% et 10,7% ; 8,8% et 12% de DiAGA et TriAGA.

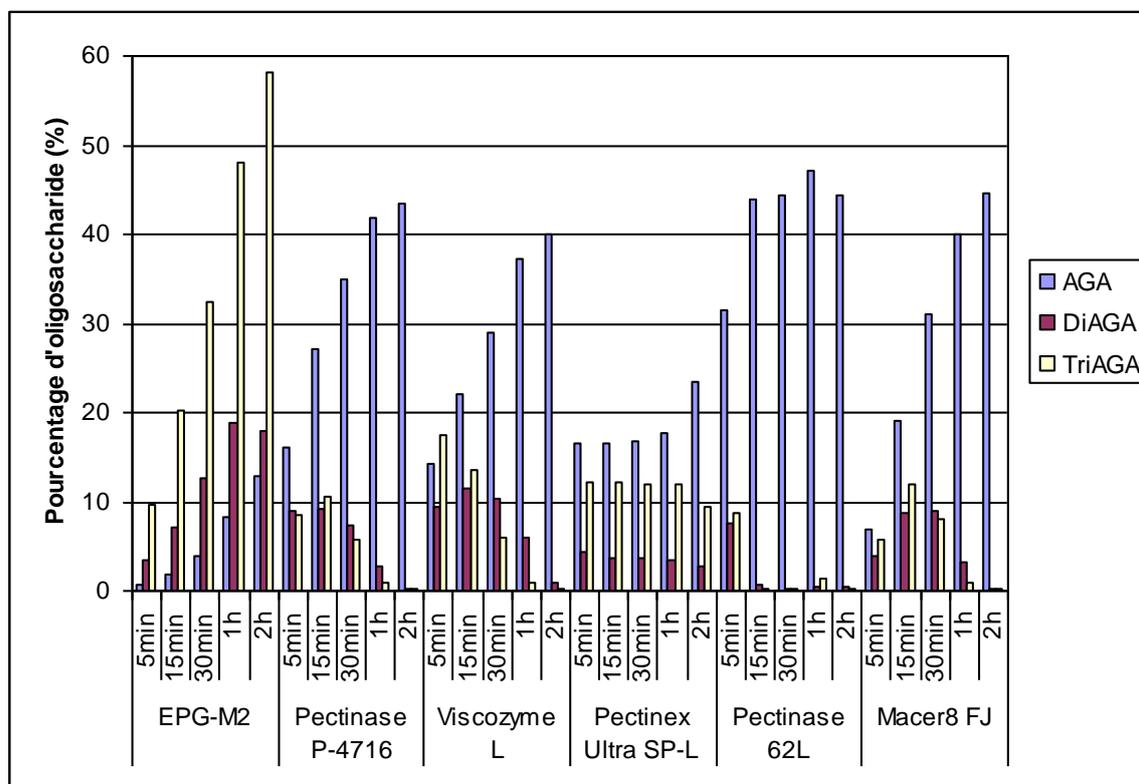


Figure 23: Rendements en oligogalacturonides (DP 1-3) obtenus par traitement de l'acide polygalacturonique avec les pectinases commerciales.

Par ailleurs, les préparations comme la Pectinase P-4716, la Viscozyme L, la Pectinex Ultra SP-L, la Pectinase 62L et la Macer8 FJ sont plus actives à produire de l'acide galacturonique au cours du temps. Le traitement de l'acide polygalacturonique avec la Pectinase 62L libère environ 47% d'acide galacturonique en seulement 1 h de réaction. Cette augmentation en acide galacturonique peut inhiber la production de POS selon Bélafi-Bako *et al.* (2007).

Tous ces résultats montrent dans quelle mesure la production de POS dépend de la préparation enzymatique et du temps d'hydrolyse. Les temps d'hydrolyse plus longs ne sont pas favorables ici puisque les POS libérés sont progressivement hydrolysés en monomère (sauf EPG). Toutefois, avec l'utilisation d'une endo-polygalacturonase telle qu'EPG-M2, il est possible de produire un mélange riche en DP3.

III.1.1.3. Conclusion

L'objectif dans cette partie du travail était de mettre en évidence parmi un lot d'enzymes, la ou les plus efficace(s) à produire des POS. La caractérisation de ces enzymes nous a permis de montrer que ces préparations commerciales contiennent différentes activités enzymatiques (endo, exo-polygalacturonase et autres), sauf EPG-M2 qui contient uniquement une endo-polygalacturonase. Le dosage par HPAEC-PAD des produits d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique avec ces pectinases permet de caractériser non seulement le mode d'action des préparations (endo et exo-polygalacturonase) mais aussi de suivre l'évolution des produits d'hydrolyse au cours du temps. Ces résultats indiquent que pour la production de POS, le temps de réaction doit être contrôlé si nous voulons minimiser la production d'acide galacturonique. Contrairement aux autres pectinases testées, l'EPG-M2 présente un faible taux de conversion des oligogalacturonides en acide galacturonique. Ainsi, après 2 heures d'hydrolyse, il a été possible de produire 18% de DiAGA et 58% de TriAGA. Par conséquent, EPG-M2 a été sélectionnée pour la suite des travaux.

III.1.2. Production de POS à partir de la pectine de betterave et caractérisation

Dans cette partie du travail, il est question de la production de POS à partir d'une pectine plus complexe : la pectine de betterave extraite au laboratoire.

Les résultats précédents ont montré que parmi les préparations commerciales testées, l'EPG-M2 est la plus efficace pour produire des POS et que par ailleurs elle contient une unique activité enzymatique, ce qui est un atout puisqu'on a parfois recours à la purification des préparations enzymatiques pour augmenter les rendements. Cependant, EPG-M2 agit sur les pectines possédant des degrés d'estérification faibles. Dans le cas de pectines estérifiées comme la pectine de betterave, EPG-M2 n'agit qu'en présence d'une pectinéméthylestérase (PME). Pour cette raison, la combinaison de l'EPG-M2 à une PME commerciale (Rapidase Smart®) a été envisagée pour la production de POS. Mais avant l'hydrolyse proprement dite, une caractérisation de la pectine de betterave et de la Rapidase smart a été effectuée. L'objectif dans cette deuxième partie est de produire différents POS et de les caractériser des points de vue structurel et physico-chimique. Les techniques analytiques telles que la chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC), la chromatographie échangeuse d'anions couplée au détecteur ampérométrique (HPAEC-PAD), l'analyse thermogravimétrique couplée à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (TGA-IRTF), l'analyse calorimétrique différentielle (ACD) et la diffraction des rayons X (DRX) ont été utilisées pour caractériser les différents POS. La pectine de betterave extraite au laboratoire et celle de betterave déestérifiée (paragraphe II.1.2) sont utilisées comme références.

III.1.2.1. Mesure des activités et pureté de la Rapidase Smart®

Les conditions expérimentales pour l'analyse des activités polygalacturonase (exo et endo) et pectinéméthylestérase (PME), ainsi que pour l'analyse de la pureté de la Rapidase Smart® sont indiquées dans le chapitre « Matériel et méthodes ». La PME hydrolyse les liaisons esters méthyliques des résidus acides galacturoniques de la chaîne pectinique. La réaction se caractérise par la libération de fonctions carboxyliques libres et du méthanol. La mesure de l'activité PME est basée sur le titrage des fonctions acides libérées en fonction du temps de réaction et du volume enzymatique. L'unité d'activité PME est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de groupement carboxyle par minute dans les conditions définies. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Caractéristiques des pectinases utilisées dans cette partie du travail (résultats de 2 répétitions).

Préparations commerciales	Protéines (mg/ml)	Activités (U/ml)		
		Exo-PG	Endo-PG	PME
EPG-M2	0,21±0,02	295,6±7,6	47774±7900	
Rapidase Smart®	0,90±0,04	22,3±0,7	42250±1061	3496±56,6

Le profil électrophorétique des pectinases est présenté à la figure 24.

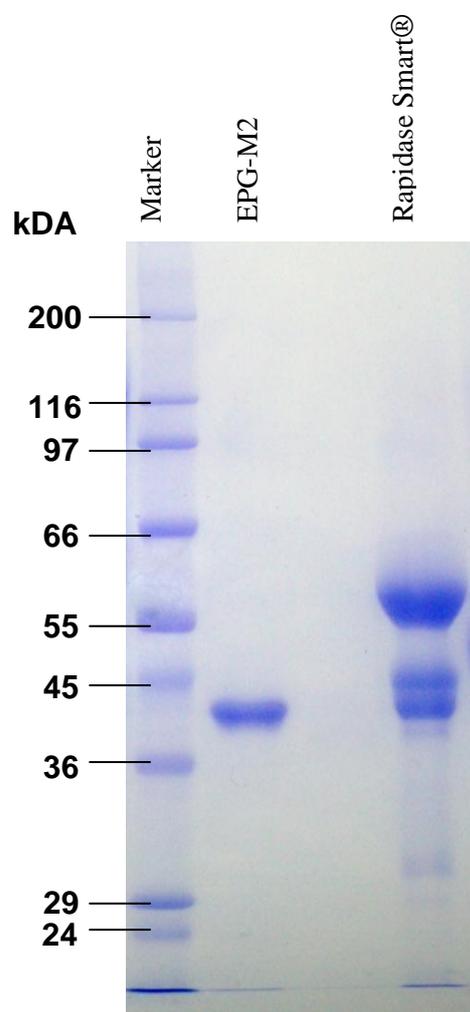


Figure 24: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS des deux pectinases commerciales utilisées lors de l'hydrolyse de la pectine de betterave.

La caractérisation de la préparation commerciale Rapidase Smart® indique que cette enzyme contient à part l'activité PME d'autres activités pectolytiques (Tableau 13). L'activité exo-PG

est 13 fois inférieure à celle de l'EPG-M2 tandis que l'activité endo-PG est comparable à celle de l'EPG-M2. L'analyse électrophorétique (Figure 24) montre la présence d'une protéine identique à celle d'EPG-M2 à MM \approx 41 kDa. Une bande protéique majeure et une autre mineure avec des masses moléculaires d'environ 56 et 45 kDa sont également observées. Ces deux masses moléculaires sont supérieures à celle des PME recombinantes obtenues des souches d'*Aspergillus aculeatus* 36,2 kDa (Christgau *et al.*, 1996), et d'*Aspergillus niger* 43 kDa (Khanh *et al.*, 1991). Elles sont cependant identiques aux isoformes (46 et 56 kDa) de la PME thermo tolérant de citron (Cameron *et al.*, 2011).

III.1.2.2. Caractérisation chimique des échantillons de pectines

La caractérisation chimique des pectines consiste notamment à déterminer leur teneur en acide galacturonique, acide férulique (AF), en sucres neutres, leur degré de méthylation et d'acétylation et leur masse moléculaire. Le tableau 14 présente l'ensemble des caractéristiques déterminées.

Tableau 14: Composition chimique (% p / p) des échantillons de pectines. DM: degré de méthylation; DA: degré d'acétylation; AF: acide férulique, M_w : masse moléculaire (résultats de 2 répétitions).

Compositions	Pectine de betterave (PB)	Pectine de betterave déestérifiée (PB De)
Rha	4,01±0,03	2,1±0,06
Ara	4,5±0,06	3,7±0,31
Xyl	0,21±0,00	0,21±0,05
Man	0,08±0,02	0,07±0,04
Gal	10,13±0,07	6,02±0,65
Glu	0,53±0,02	0,2±0,00
Total sucres neutres	19,5	12,3
AGA	59,5±0,50	54,2±0,70
DM	44±2,60	1,42±0,37
DA	35,8±1,70	8,8±0,03
AF	0,43±0,01	0,40±0,00
M_w (kDa)	263,0	222,4

L'acide galacturonique est le principal constituant de la pectine. La teneur en AGA obtenue (59,5%) est proche de celle de travaux antérieurs (Axelos *et al.*, 1991). Les principaux monosaccharides constitutifs de la pectine de betterave sont par ordre d'importance : le galactose, l'arabinose et le rhamnose. Les sucres minoritaires sont le glucose, le xylose et le mannose.

Les groupements carboxyliques des pectines sont partiellement méthylés et les carbones C₂ et/ou C₃ acétylés. Le degré de méthylation et d'acétylation ont été déterminés après saponification des pectines et injection en HPLC. Les valeurs de DM et DA obtenues sont dans la gamme de celles déterminées dans le cadre de travaux antérieurs (Rombouts *et al.*, 1986 ; Guillon *et al.*, 1988). La teneur en acide férulique contenue dans les pectines (0,43%) est en accord avec ceux rapportés par Rombouts *et al.* (1986). La déestérification en milieu alcalin entraîne une dégradation de la pectine de betterave. D'après Van der Poel *et al.* (1998), cette dégradation est d'autant plus importante que l'estérification de la pectine est importante. Une réduction de la teneur en sucres neutres ainsi que de la longueur des chaînes d'acide galacturonique produite par β -élimination est observée. Par ailleurs, l'acide férulique résiste mieux dans le milieu alcalin que les groupements acétyles et méthyles esters (Tableau 14).

III.1.2.3. Hydrolyse de la pectine de betterave et caractérisation physico-chimique des produits d'hydrolyse

Dans l'optique de produire des POS, la pectine de betterave a été hydrolysée par une endopolygalacturonase associée à une PME. Les conditions d'hydrolyse sont décrites au paragraphe II.2.3.1.2. Les POS produits ont été ensuite caractérisés.

III.1.2.3.1. Analyse de la distribution de taille des hydrolysats

La triple détection a été utilisée pour analyser les produits d'hydrolyse de la pectine. Il s'agit d'une technique alliant la chromatographie d'exclusion de taille à trois détecteurs: de diffusion de lumière, d'indice de réfraction et un viscosimètre. La combinaison des différentes données permet de déterminer la masse moléculaire moyenne en masse (M_w) d'un mélange de polymères. Il a été ainsi possible de suivre l'action des enzymes sur la masse moléculaire de la pectine. La distribution des masses moléculaires des produits obtenus au cours de l'hydrolyse de la pectine de betterave est présentée à la figure 25. La dégradation de la pectine est effective dès le contact avec l'enzyme (EPG-M2 et Rapidase Smart®). Une diminution rapide de la fraction polysaccharidique de haute masse moléculaire est observée après deux

minutes d'hydrolyse (PB-2'). La distribution des masses moléculaires des hydrolysats est très large, ce qui indique une hétérogénéité moléculaire des produits obtenus par l'action des enzymes. D'autre part, le traitement enzymatique de la pectine de betterave avec la combinaison de l'EPG-M2 et de la Rapidase Smart® conduit à la libération de faibles quantités d'acide galacturonique.

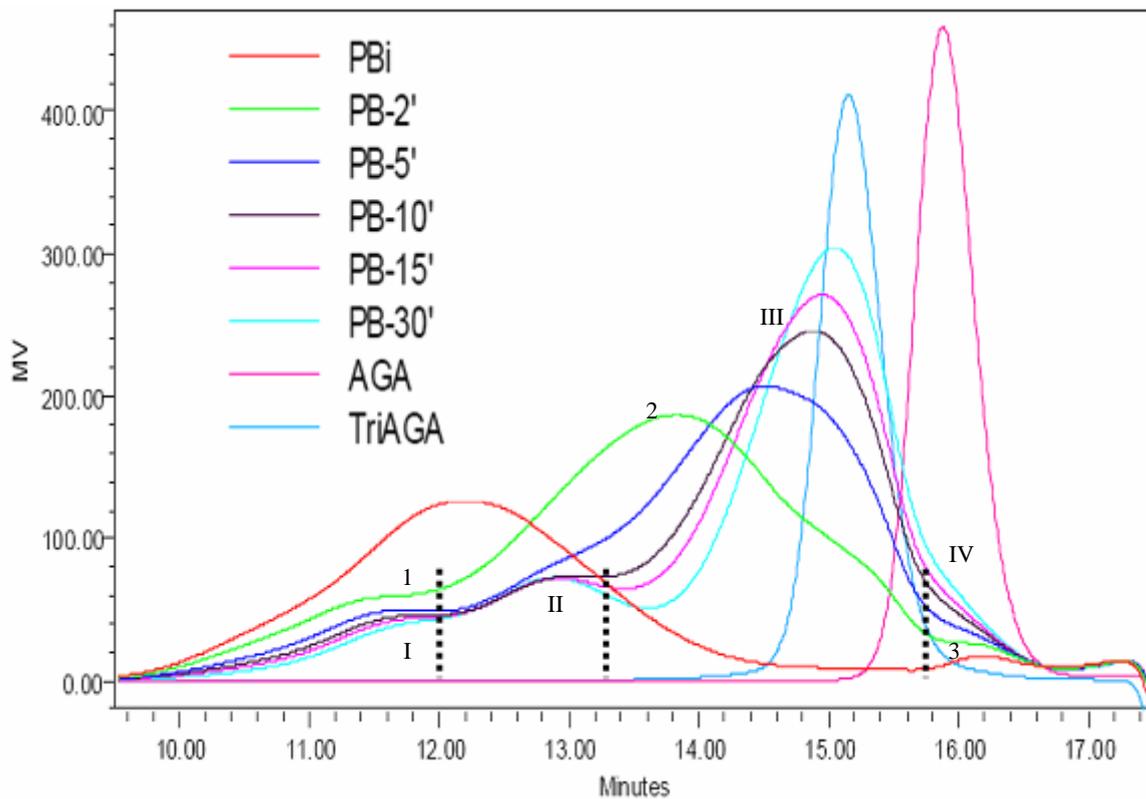


Figure 25: Comparaison des chromatogrammes obtenus par HPSEC des hydrolysats enzymatiques de la pectine de betterave en présence d'EPG-M2 et Rapidase Smart® à différents temps d'hydrolyse avec PBi : pectine de betterave initiale, PB-2' : hydrolysat 2 min, PB-5' : hydrolysat 5 min, PB-10' : hydrolysat 10 min, PB-15' : hydrolysat 15 min, PB-30' : hydrolysat 30 min, AGA : acide galacturonique et TriAGA : triacide galacturonique. Les chiffres 1, 2 et 3 font référence aux différentes fractions présentes dans l'hydrolysat 2 min tandis que les chiffres romains I, II, III et IV font référence aux fractions des autres hydrolysats.

Comme le montre la figure 25, les profils d'élution des hydrolysats sont dans certains cas subdivisés en trois fractions (cas de l'hydrolysat 2 min, PB-2') voire quatre fractions pour les autres. Les proportions des différentes fractions moléculaires ont été évaluées en considérant seulement les aires des pics chromatographiques relatifs à ces différentes fractions. Les résultats exprimés en aire relative par la relation ci-dessous sont présentés à la figure 26.

$$Aire_{relative} = \frac{\text{aire du pic d'élution de la fraction moléculaire considérée}}{\text{aire totale du chromatogramme}} \times 100$$

(Eq.12)

Il ressort de ces résultats que l'hydrolyse de la pectine de betterave à 2 minutes, se traduit par la libération prépondérante de deux familles moléculaires. Au cours du temps, on constate une diminution très rapide de la fraction 2 avec une apparition prépondérante de la fraction 3 suivie de la fraction 4.

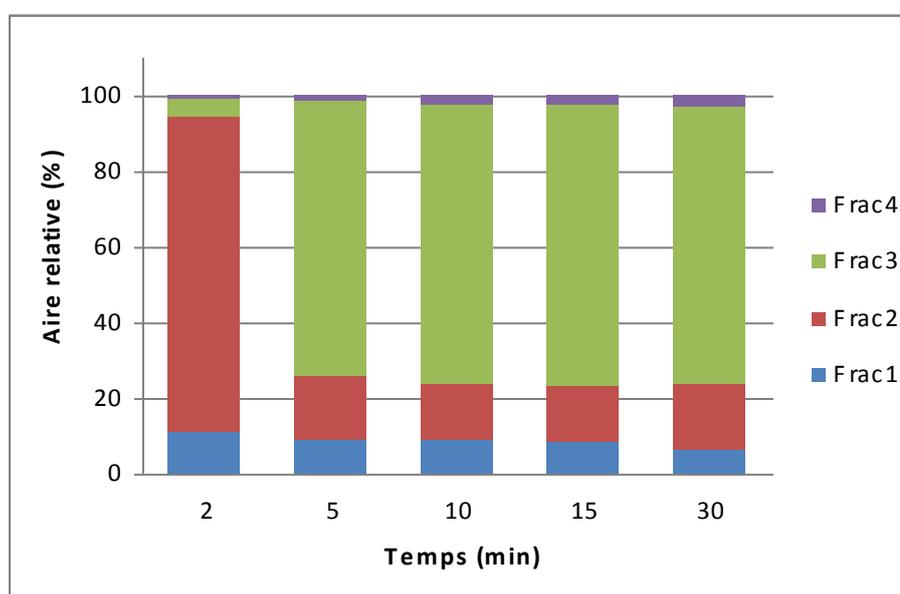


Figure 26: Effet de la durée sur la distribution des fractions moléculaires des produits d'hydrolyse de la pectine de betterave.

Puisqu'il est question dans cette étude de produire différents POS et de les caractériser, une analyse en composantes effectuée sur l'ensemble des hydrolysats (figure 26) nous a permis de sélectionner les hydrolysats 2, 5 et 15 minutes pour la suite. Afin de réaliser l'analyse quantitative de la distribution des produits d'hydrolyse dans ces hydrolysats, la masse moléculaire moyenne au pic (M_{wp}), le degré de polymérisation moyen au pic (DP_p) et la proportion de chaque famille moléculaire ont été déterminés (Tableau 15). Les masses moléculaires des différents hydrolysats varient dans une large gamme, les valeurs les plus élevées étant obtenues aux fractions F1 et F2. Ceci peut être le fait de matériaux agrégés qui conduit à une surestimation de la masse moléculaire et donc à des DP importants.

Tableau 15 : Evolution des masses moléculaires (M_{wp}), des degrés de polymérisation moyen (DP_p) et des proportions (P) de chaque fraction moléculaire (F1, F2, F3 et F4) au cours de l'hydrolyse enzymatique de la pectine de betterave avec l'EPG-M2 et la Rapidase Smart®.

	PB 2min			PB 5min			PB 15min		
	M_{wp} (kDa)	DP_p	P(% p/p)	M_{wp} (kDa)	DP_p	P(% p/p)	M_{wp} (kDa)	DP_p	P(% p/p)
F1	422	2398	6.1	408	2318	4.6	404	2293	3.4
F2	14	80	76.3	98.1	558	8.6	84,3	479	14.9
F3	1.8	10	2.3	8.1	46	71.1	6	34	65.8
F4	/	/	/	1.9	11	3.1	1.6	9	3.2

Par ailleurs, la diminution de la M_w s'accompagne de la formation d'oligosaccharides de faibles DP et de l'augmentation de leur proportion. La production de POS de faible DP a été possible notamment aux fractions F3 et F4 des hydrolysats 2 min et 5, 15 min respectivement. Ces résultats nous permettent de regrouper ces différentes fractions en deux polymères, comme suit :

- FM1 & FM2 : Polymères de haute masse avec M_{wp} compris entre 10 kDa et 450 kDa, soit un DP_p compris entre 80 et 2557
- FM3 & FM4 : oligomères de M_{wp} compris entre 1,6 kDa et 8,2 kDa, soit un DP_p compris entre 9 et 47

III.1.2.3.2. Analyse des hydrolysats produits par chromatographie d'échange d'anions

Pour étudier la formation de POS, les produits d'hydrolyse de la pectine de betterave ont été analysés par HPAEC-PAD. Les conditions analytiques utilisées dans cette étude permettent seulement de séparer sélectivement les oligomères d'acide galacturonique jusqu'à DP 9. L'élution a été effectuée à pH alcalin. Les produits ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec des standards d'acide galacturonique (DP 1 à 3). Comme les oligomères supérieurs à DP3 ne sont pas disponibles dans le commerce, l'acide polygalacturonique a été également dégradé (paragraphe II.2.3.2.1) et utilisé pour identifier les produits de dégradation de la pectine de betterave. L'ordre d'élution des POS augmente avec le degré de polymérisation et il y a une bonne corrélation ($y = 1,43x + 9,33$; $R^2 = 0,97$) entre le DP et la valeur du temps de rétention (Figure 27).

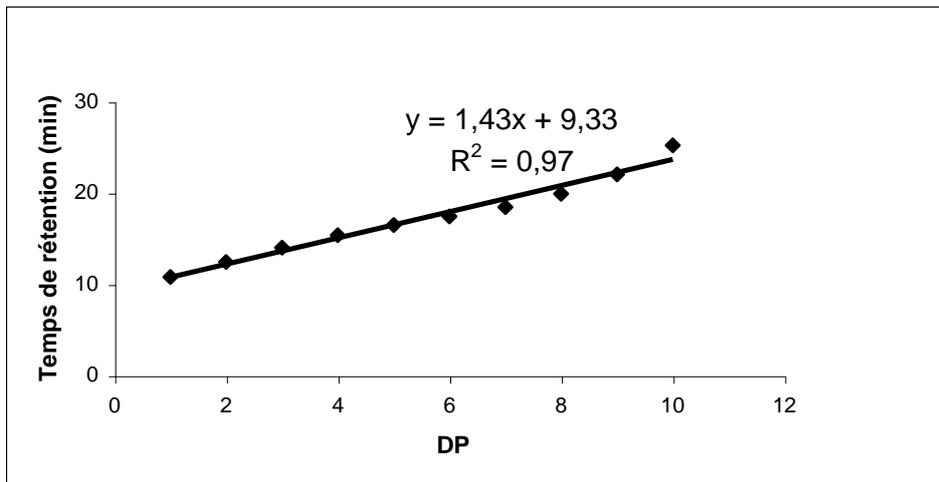


Figure 27: Relation entre le temps de rétention et DP des différents oligogalacturonides présents dans l'hydrolysat de l'acide polygalacturonique.

Le chromatogramme des POS issus de l'hydrolyse enzymatique de la pectine de betterave est montré à la figure 28. Les résultats montrent la présence de mélange d'oligogalacturonides après 2 minutes d'hydrolyse. Les POS obtenus ont pu être séparés jusqu'à un DP de neuf unités. Le pic correspondant à l'acide galacturonique est également présent dans les profils. Comme le montre la figure 28, lors de l'hydrolyse prolongée durant 30 minutes, une augmentation de la surface des pics des oligogalacturonides est observée.

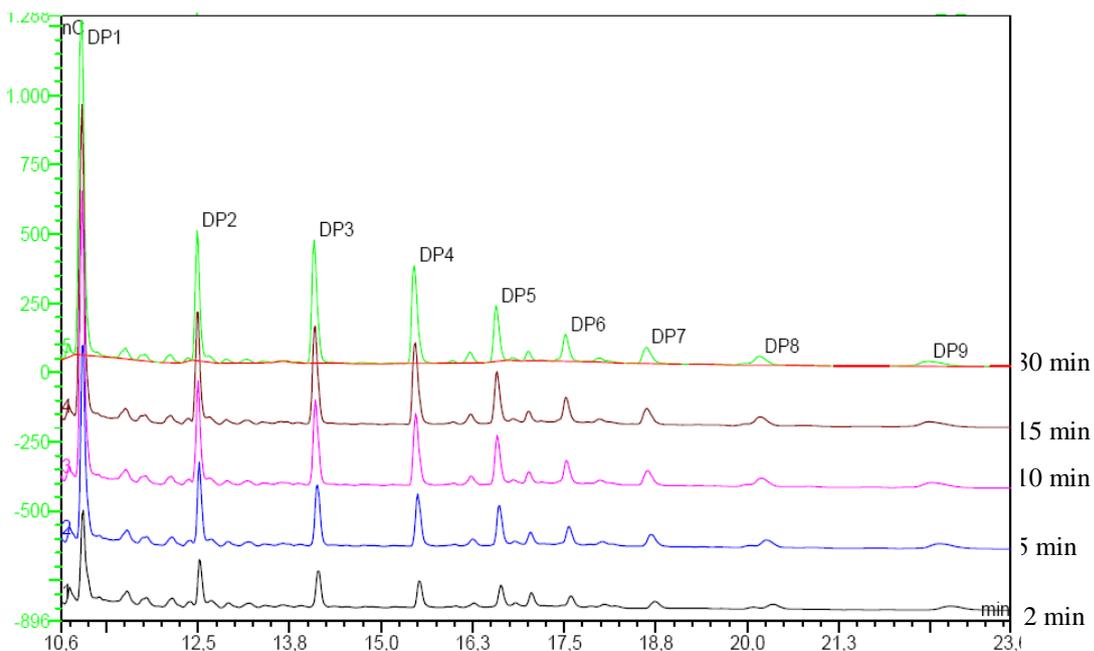


Figure 28: Profil de dépolymérisation de la pectine de betterave par action combinée de l'EPG-M2 et de la Rapidase Smart® à différents temps d'hydrolyse (indiqués à droite).

Nous pouvons aussi observer que la réponse du détecteur PAD est fonction du type de DP. Elle n'est pas uniforme pour un même groupe fonctionnel. Le facteur de réponse décroît avec l'augmentation du nombre de DP. Ceci est illustré par la figure 22 au paragraphe III.1.1.2.2. En effet, pour une même concentration, le facteur de réponse du DP1 est environ 3 fois et 4 fois supérieur à celui du DP2 et DP3 respectivement. Cette baisse de réponse est le fait qu'une molécule de DP élevé possède un coefficient de diffusion faible, ce qui rend difficile son accès à la surface de l'électrode. La réponse sera donc moins importante par rapport à une molécule plus petite avec un coefficient de diffusion plus élevé (Torto *et al.*, 1997).

Les oligomères d'acide galacturonique (DP1 à 3) formés dans les hydrolysats 2 min, 5 min et 15 min ont été quantifiés. Une droite d'étalonnage mettant en relation la surface des pics et la concentration des standards d'oligomères d'acide galacturonique a été établie comme précédemment décrit au paragraphe III.1.1.2.2. Les concentrations ont été calculées à partir des chromatogrammes HPAEC-PAD et exprimées en pourcentage de la masse totale de pectine. Les proportions des trois DP (1 à 3) pour chacun des hydrolysats sélectionnés sont indiquées dans le tableau 16. Ces résultats montrent une augmentation des oligomères au cours du temps, avec une teneur en DP3 restant la plus élevée. Cette présence du DP3 concorde avec les résultats obtenus lors de l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique par l'EPG-M2 (Figure 23). L'impact des deux enzymes (EPG-M2 et Rapidase Smart®) associées paraît donc évident. Par ailleurs, le ratio DP3/DP1 diminue au cours du temps, mettant en évidence une hydrolyse partielle du DP3 en DP1.

Tableau 16: Pourcentages (p/p) d'oligomères d'acide galacturonique libéré lors de l'hydrolyse de la pectine de betterave

Temps d'hydrolyse (min)	AGA	DiAGA	TriAGA	TriAGA/AGA
2	4,0	5,7	9,5	2,40
5	8,2	10,2	16,0	1,95
15	14,2	14,7	26,6	1,87

III.1.2.4. Caractérisation des propriétés physiques des poudres de POS obtenues

Pour la caractérisation des propriétés physiques des POS obtenus, les hydrolysats ont d'abord été concentrés au rotavapor, congelés puis lyophilisés pour obtenir des poudres. L'analyse thermique a pour objet la caractérisation des produits par l'étude de leurs propriétés ou

changement d'état en fonction de la température et du temps. Dans le but d'étudier les propriétés physiques des différents POS obtenus en rapport avec leur différence de structure, des analyses physico-chimiques ont été menées. A cette fin, les propriétés physiques et de stabilité ont été étudiées par analyse thermogravimétrique (ATG) couplée à la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), analyse calorimétrique différentielle, diffraction des rayons X et par microscopie optique.

Il est important de noter que dans cette étude, la pectine de betterave déstérifiée ou non a été utilisée comme référence.

III.1.2.4.1. Analyses thermogravimétriques (ATG) et spectrométrie infrarouge

C'est une technique qui permet d'étudier l'évolution de la masse de l'échantillon lorsque celui-ci subit une montée en température. L'analyse thermogravimétrie permet ainsi, d'obtenir une quantification de la perte d'éléments constituant de l'échantillon et de surveiller sa stabilité thermique. Les thermogrammes des échantillons : pectine de betterave, pectine de betterave déstérifiée et des hydrolysats (2 min, 5 min et 15 min) sont illustrés à la figure 29.

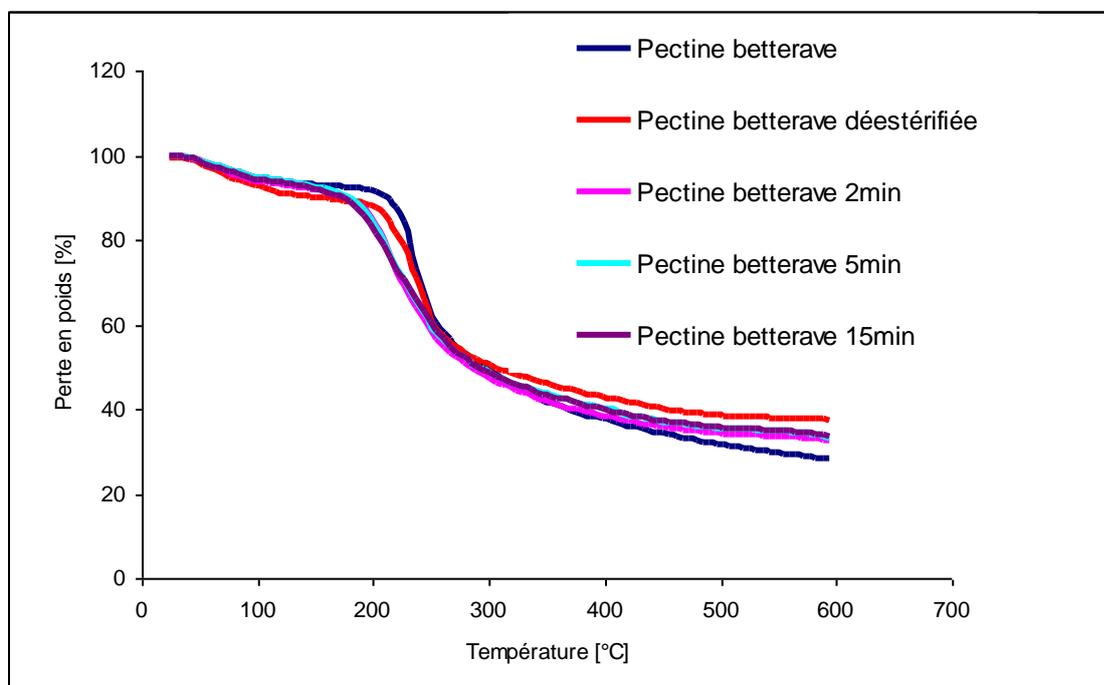


Figure 29: Thermogrammes ATG des poudres de pectines et POS obtenus à une vitesse de chauffe de 5°C/min sous atmosphère d'azote (résultats de 2 répétitions).

La perte en masse commence dès le début de l'analyse thermogravimétrique vers 25°C. Trois paliers de perte en masse sont observés quel que soit l'échantillon. Le premier situé entre 50-150°C correspond à la perte en eau des échantillons au cours de la montée en température selon les travaux de Zhou *et al.* (2011). Cette perte en masse évaluée se situe entre 7 et 10%. Cependant, la perte de masse est plus importante chez les pectines modifiées que chez la pectine native. Cela laisse à penser que, comme la déméthylation entraîne l'apparition de nouvelles fonctions carboxyliques libres, une plus grande quantité des groupements hydroxyles interagissent avec les molécules d'eau.

Le deuxième palier situé entre 150-350°C correspond à une perte en masse de 43 à 47% en raison de la décomposition des échantillons se traduisant par la rupture des chaînes d'acide galacturonique, le dégagement de produits gazeux et la formation de résidus carbonisés. Enfin le troisième palier aux températures supérieures à 350°C correspond à la carbonisation des résidus.

La première dérivée de la courbe ATG (Figure 30) est proportionnelle à la vitesse de décomposition. Elle montre clairement les températures maximales de déshydratation (vers 90°C) et de décomposition des échantillons analysés. La dégradation thermique des POS a lieu en deux étapes tandis que celle des échantillons de pectines est en une étape. Ainsi la pectine de betterave et la pectine de betterave déstérifiée se décomposent à environ 238°C et 244°C respectivement. Les POS, eux, présentent des profils similaires. Un premier pic de décomposition aux environs de 215°C et un second pic aux environs de 244°C. La dégradation thermique des POS débute donc avant celle des pectines, ce qui indique une stabilité thermique plus faible des POS. Par ailleurs, les POS affichent de larges pics par rapport aux pectines. Cela peut être corrélé à l'hétérogénéité des POS, constituées d'oligosaccharides qui ont des températures de stabilité thermique différentes selon Einhorn-Stoll et Kunzek (2009). De plus le degré de méthylation pourrait expliquer cette diminution de stabilité thermique, car la déméthylation conduit à démasquer les fonctions carboxyliques des pectines, ce qui permet la formation de liaisons hydrogènes inter- et intra-moléculaire, favorisant ainsi la dégradation thermique des POS (Einhorn-Stoll *et al.*, 2007 ; Einhorn-Stoll et Kunzek, 2009).

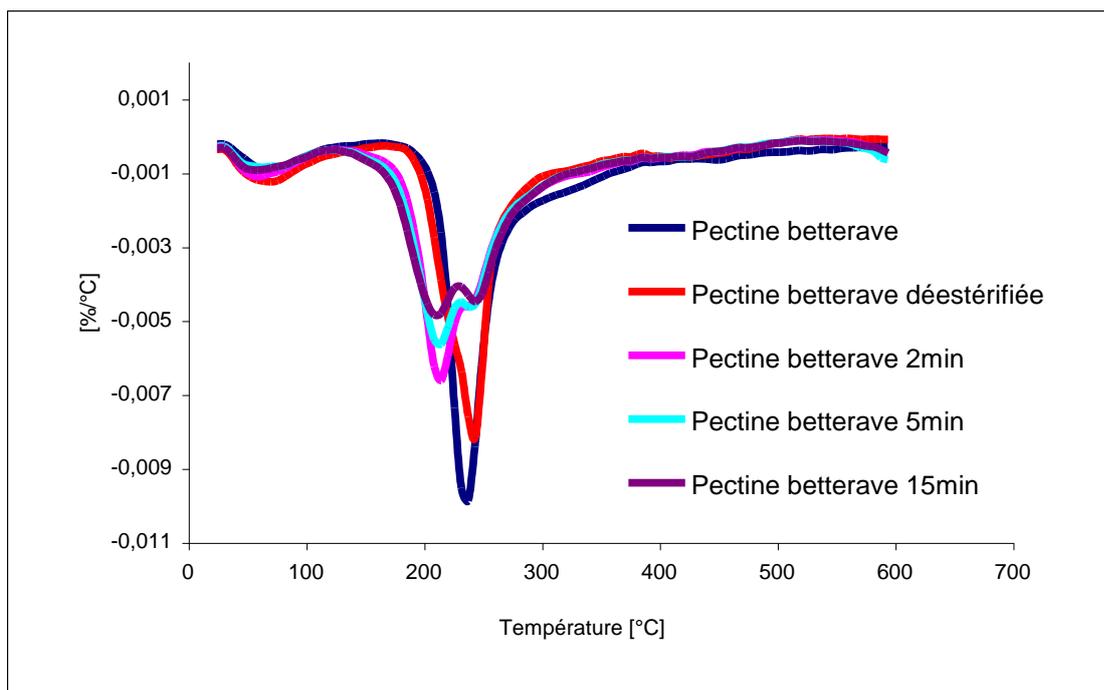


Figure 30: Dérivée première des thermogrammes ATG des poudres de pectines et POS obtenus à une vitesse de chauffe de 5°C/min sous atmosphère d'azote (résultats de 2 répétitions).

Les résultats obtenus à partir des courbes thermogravimétriques montrent que l'hydrolyse enzymatique de la pectine de betterave entraîne une diminution de la température de dégradation. Ce qui montre qu'une modification structurale de la molécule a une influence considérable sur le comportement au feu du produit. Ces mesures apportent des données fondamentales sur la stabilité thermique des POS mais pourrait également avoir une importance dans des applications incorporant des POS et devant subir des traitements thermiques pour leur préparation dans les produits alimentaires.

Comme on peut le constater, l'ATG permet donc, entre autres la détermination de la stabilité thermique et les conditions optimales de traitement des échantillons mais ne nous renseigne en rien sur les gaz rejetés lors de la perte en masse des échantillons. Une description détaillée des produits volatils de décomposition n'est toutefois possible qu'avec l'aide de la combinaison de l'ATG et d'un IRTF. Les analyses simultanées ATG-IRTF sont très intéressantes en raison du temps de mesure nécessaire relativement faible mais aussi en raison de l'identification des gaz de pyrolyse à tout moment de la mesure. La figure 31 présente les spectres IRTF en 3D (fonction de l'absorbance, du nombre d'ondes et du temps) des produits de décomposition sous forme gazeuse des échantillons.

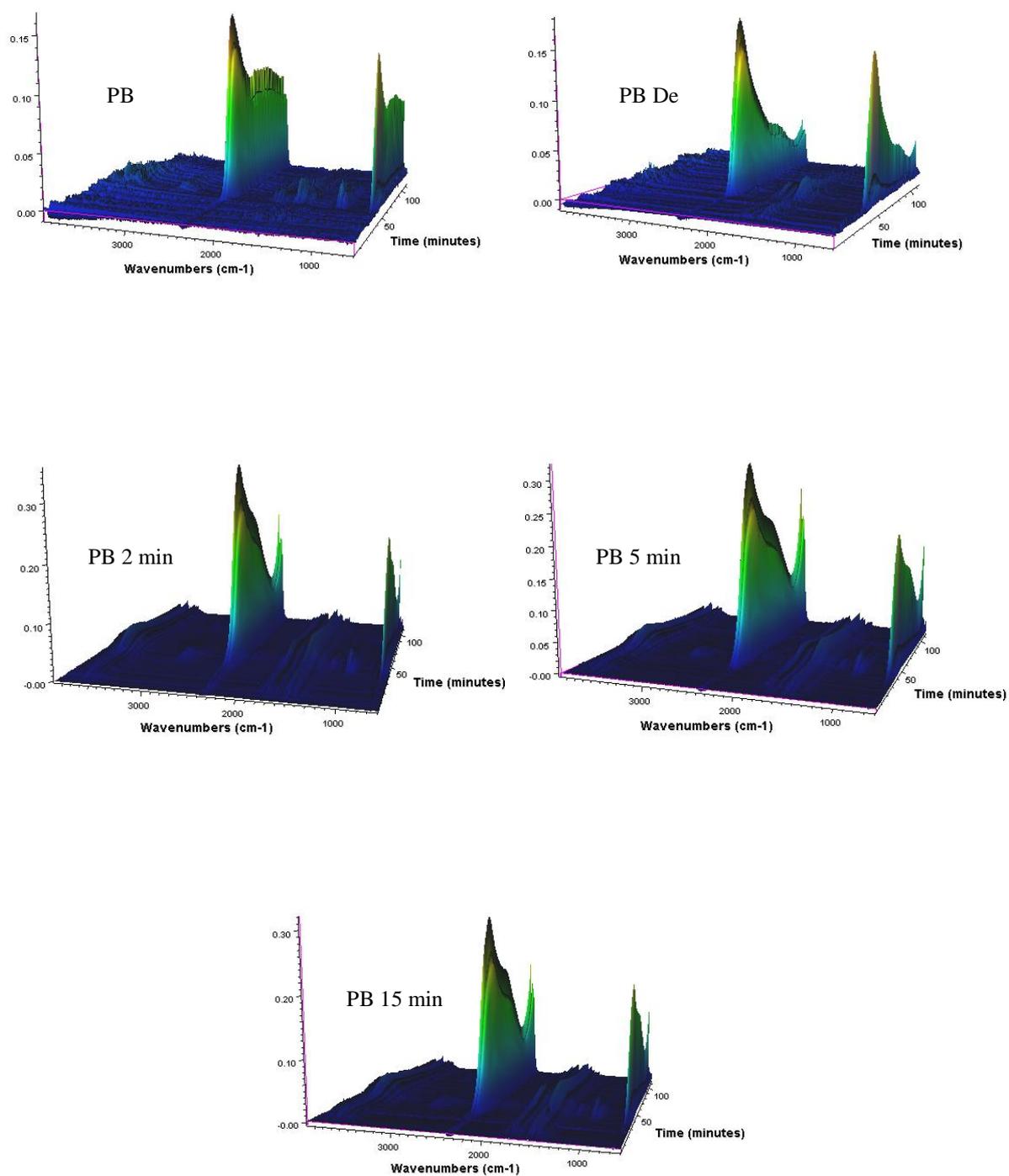


Figure 31: Graphes en 3D des spectres IRTF des gaz émis lors du chauffage des échantillons avec PB : pectine de betterave, PB De: pectine de betterave déstérifiée, PB2 min: hydrolysat 2 min, PB5 min: hydrolysat 5 min, et PB15 min: hydrolysat 15 min.

Une représentation plus en détail du spectre 2D (Figure 32) permet de mieux apprécier les produits de décomposition des différents échantillons.

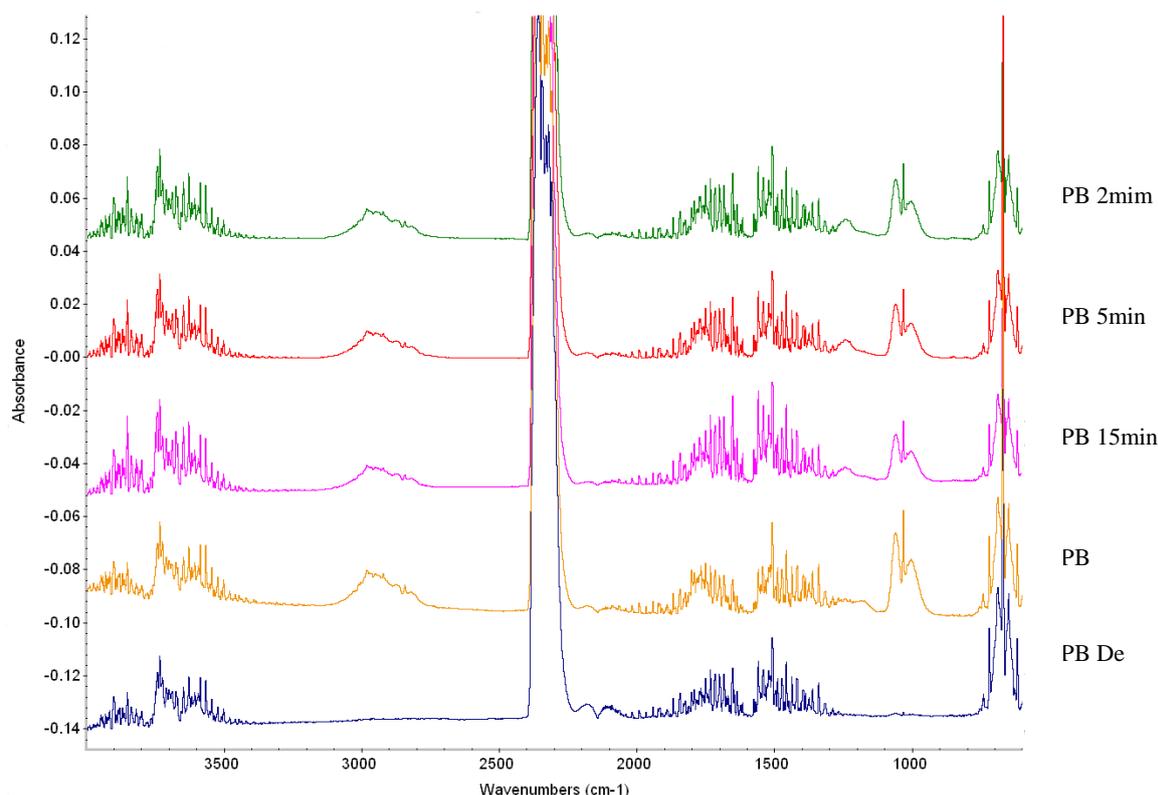


Figure 32: Spectres IRTF des différents échantillons analysés avec PB: pectine de betterave, PB De: pectine de betterave déestérifiée, PB-2 min: hydrolysats 2 min, PB5 min: hydrolysats 5 min et PB15 min: hydrolysats 15 min.

Les spectres présentent plusieurs bandes d'absorption qui témoignent de la complexité du mécanisme de décomposition. Cependant, certains produits gazeux ont pu être identifiés à l'aide des bandes d'absorption caractéristiques des groupes fonctionnels. Ainsi les gaz comme l'eau ($3990-3400\text{ cm}^{-1}$), les hydrocarbures ($3100-2600\text{ cm}^{-1}$), le dioxyde de carbone ($2419-2240\text{ cm}^{-1}$), le monoxyde de carbone ($2240-2040\text{ cm}^{-1}$), les composés carbonyles ($1999-1600\text{ cm}^{-1}$) et le méthanol ($1120-920\text{ cm}^{-1}$) ont été identifiés. La dégradation thermique des échantillons est surtout dominée par le dioxyde de carbone. Des travaux récents sur la pyrolyse de la pectine de citron de Zhou *et al.* (2011) présentent des spectres très comparables aux nôtres.

Le spectre de la pectine de betterave déestérifiée se différencie des autres spectres par l'absence des bandes caractéristiques du méthanol et des hydrocarbures qui prouve son caractère déméthylé.

La libération des produits peut également être déterminée en fonction du temps à partir de la hauteur et de l'aire des bandes caractéristiques des produits. Ceci permet de faire une évaluation semi-quantitative des quantités libérées lors de la pyrolyse (Figure 33).

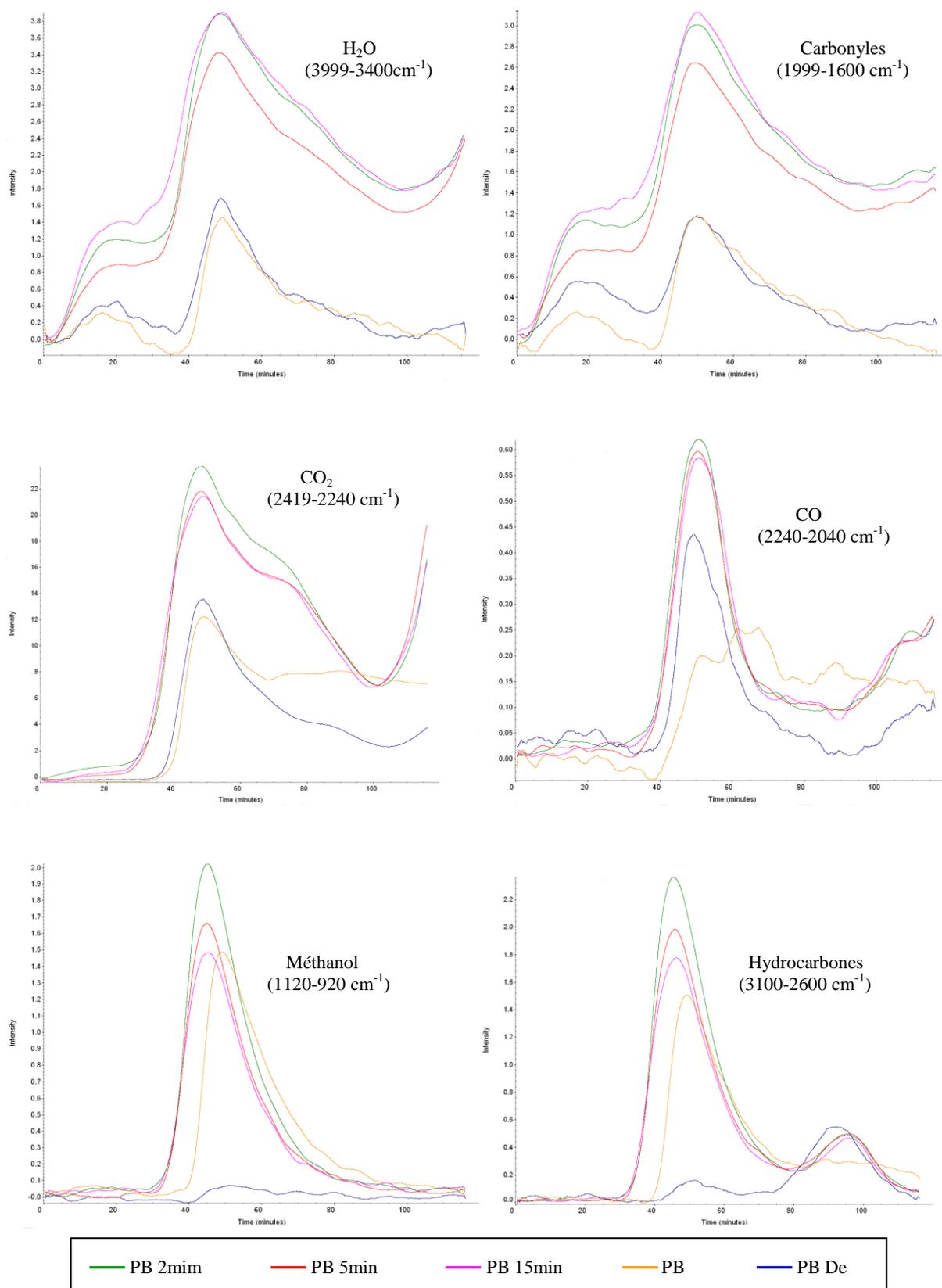


Figure 33: Evolution des différents produits gazeux (eau, carbonyles, dioxyde de carbone, monoxyde de carbone, méthanol et hydrocarbures) lors de la pyrolyse des échantillons de pectine et des POS avec PB : pectine de betterave, PB De: pectine de betterave déstérifiée PB2 min: hydrolysat 2 min, PB5 min: hydrolysat 5 min et PB15 min: hydrolysat 15 min.

Généralement, les échantillons présentent les mêmes tendances de formation de produits gazeux avec plus d'émission chez les POS. Deux fois plus d'eau, de carbonyle et de dioxyde de carbone sont libérés par les POS comparé aux échantillons de pectine. La quantité du monoxyde de carbone est pratiquement identique pour les POS alors que les quantités du méthanol et d'hydrocarbure diminuent avec le temps d'hydrolyse.

Au début de la décomposition, à environ 20 minutes (ce qui correspond à environ 100°C), seuls l'eau et le carbonyle sont formés. Selon Shen *et al.* (2009), l'émission de l'eau à basse température est due à l'évaporation de l'eau absorbée par les échantillons et celle du carbonyle résulte de la dégradation thermique des chaînes d'acide galacturonique. Au-delà de 20 minutes, tous les principaux gaz mentionnés ci-dessus sont émis, le CO₂ étant le plus abondant. La seconde émission de l'eau est due à la rupture des groupes hydroxyles dans les chaînes latérales (Liu *et al.*, 2008). En outre, la deuxième émission du carbonyle est provoquée par la dégradation thermique importante des chaînes d'acide galacturonique (Shen *et al.*, 2009). Hajaligol *et al.* (1999) ont indiqué qu'entre 200 et 300°C (40 et 60 min), l'émission de CO₂ est due à la dissociation du carboxyle dans les chaînes latérales, et au-delà de 300°C, le CO₂ est produit par la rupture des groupes carboxyliques dans la structure cyclique de la pectine. L'émission de CO est quant à elle due à la rupture des liaisons CO dans les ponts éthers joignant les sous-unités des pectines (Amen-Chen *et al.*, 2001). L'émission du méthanol est presque inexistante dans la pectine déestérifiée en raison de la déméthylation, puisque les groupes méthoxyles dans la structure de la pectine sont les facteurs les plus probables à la formation de méthanol (Souza *et al.*, 2009). La formation d'hydrocarbures est provoquée par la décomposition thermique du méthanol et par le clivage de groupes méthyles dans les chaînes latérales de la pectine. Cependant, la libération des hydrocarbures est observée après 70 min (350°C) sans aucune émission de méthanol. Ceci indique que ces émissions sont dues aux groupes méthyles présents dans les chaînes latérales de la pectine. Comme on peut le voir, les POS atteignent leur maximum d'émission à 45 min (225°C) pendant que les échantillons de pectine atteignent les leurs à 50 min (250°C). Ces températures d'émission se situent dans la deuxième phase de décomposition (150-350°C) où une perte importante de la masse des échantillons est observée (Figure 29). Les produits de la pyrolyse des différents échantillons prouvent qu'il n'existe pas de transformations majeures des groupes fonctionnels lors de l'hydrolyse enzymatique de la pectine de betterave. Les résultats obtenus à partir des spectres IRTF suggèrent des réactions de décomposition telles que la déshydratation, la décarboxylation, la dépolymérisation, la déestérification et la déhydroxylation.

III.1.2.4.2. Analyses calorimétriques différentielles (ACD)

L'ACD a été utilisée pour étudier les transitions thermiques qui se produisent au cours du chauffage des échantillons sous atmosphère inerte. La figure 34 présente les calorigrammes des différents échantillons.

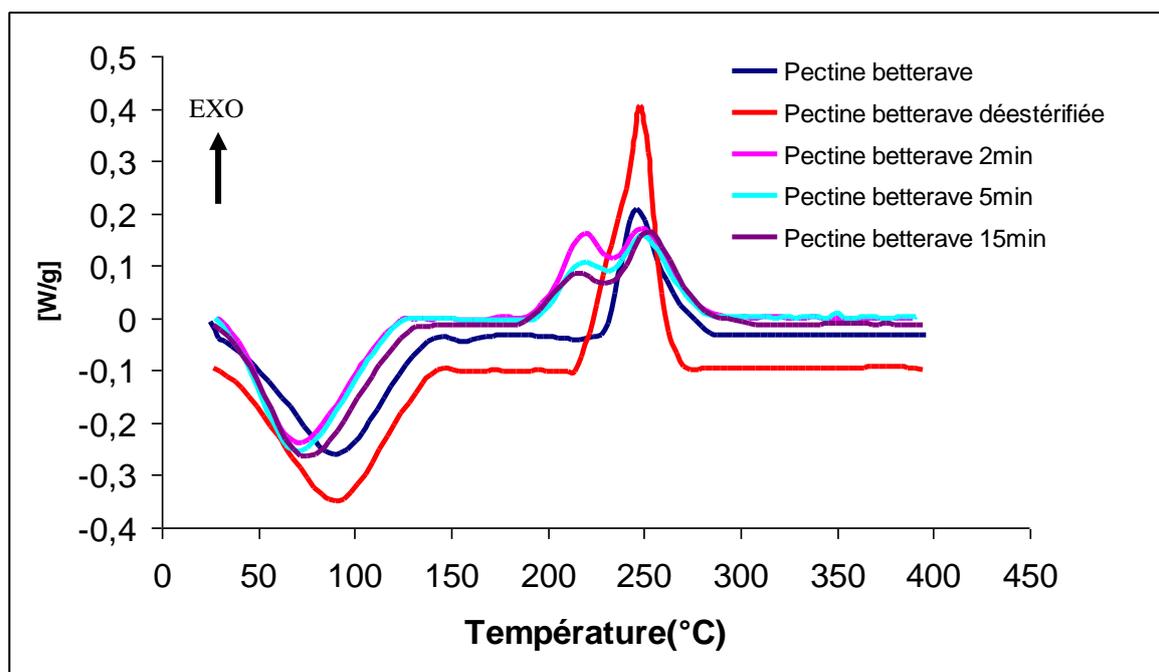


Figure 34: Thermogrammes ACD des poudres de pectines et POS obtenus à une vitesse de chauffe de 5°C/min sous atmosphère d'azote (résultats de 2 répétitions).

Les étapes de la déshydratation et de la dégradation des échantillons observées avec l'analyse thermogravimétrique sont clairement mises en évidence par l'ACD. On note une corrélation entre le signal ATG et le signal ACD (figures 29 et 34). Les transitions associées à la perte d'eau, correspondant aux pics endothermiques sont comprises entre 25 et 150°C. Au delà de 150°C, des réactions exothermiques se produisent, ce qui correspond à la dégradation et à l'élimination des produits volatils du polymère (Einhorn-Stoll *et al.*, 2007). L'un des objectifs dans cette étude était de déterminer la température de transition vitreuse (Tg) des POS, caractérisée par le passage des solides amorphes d'un état vitreux à un état caoutchouteux sous l'effet de la chaleur (Binder *et al.*, 2003), mais nous n'avons pas observé de Tg dans la gamme de température utilisée, mais également dans une gamme plus large débutant à -50°C. La raison pourrait être attribuée à une interférence de la Tg avec le pic endothermique

d'humidité surtout que la Tg est influencée par la teneur en eau et le poids moléculaire du produit, ou à une réorganisation structurale au cours de la montée en température. L'hétérogénéité du produit et aussi celle de la longueur des chaînes sont autant de facteurs qui pourraient expliquer que la détermination de la Tg soit difficile.

Ces résultats thermiques constituent un point de départ important dans la caractérisation des POS surtout pour un développement futur de produits naturels à valeur ajoutée. En effet, les pectines et les oligosaccharides dérivés de pectines sont classées comme fibres alimentaires et en tant que tels, ils peuvent être ajoutés aux produits alimentaires qui peuvent être soumis à une température plus élevée, comme le pain, les gâteaux et les pâtisseries par exemple, il est donc intéressant d'évaluer la stabilité thermique des ces produits.

III.1.2.4.3. Analyses par diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse RX a permis d'étudier l'organisation structurale avant et après traitement enzymatique de la pectine de betterave. La méthode permet d'évaluer les proportions de matière cristalline et amorphe d'un échantillon. Les diffractogrammes des poudres de pectines et de POS enregistrés dans la gamme $6^\circ < 2\theta < 33^\circ$ sont présentés à la figure 35. Plusieurs pics de diffraction sont observés à environ 14° , 21° , $26,4^\circ$ et 32° dans les échantillons de pectine. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Georget *et al.* (1999), Mangiacapra *et al.* (2006) et Panchev *et al.* (2010) lesquels ont montré des pics de diffraction à $2\theta = 13,6^\circ$ et $21,6^\circ$ dans la pectine de citron, 13° et 21° dans la pectine de pomme et $14,2^\circ$, $18,1^\circ$, $28,2^\circ$ et $32,1^\circ$ dans la pectine de tournesol respectivement. Ceci indique que les échantillons de pectine ont une structure semi-cristalline et que la pectine est un mélange de deux types de structures de réseaux moléculaires. Après hydrolyse, les POS se distinguent des échantillons semi-cristallins par des diffractogrammes à allure bombée caractéristiques d'un état amorphe très majoritaire. Les POS ont perdu la structure ordonnée (pics de diffraction) et deviennent plus amorphes que les échantillons de pectine. La manière de préparer les poudres de POS pourrait être à l'origine de cette structure amorphe. Les POS obtenus après hydrolyse ont été lyophilisés. Selon Hilden et Morris (2004), le séchage rapide d'une solution (lyophilisation, atomisation) ou le refroidissement rapide de cristaux fondus peuvent être à l'origine de la phase amorphe d'une poudre. Ainsi, on peut supposer que les POS amorphes obtenus ici sont une conséquence de la lyophilisation. Une autre hypothèse serait que le traitement enzymatique conduit à une déstabilisation et ou à une destruction de la région cristalline.

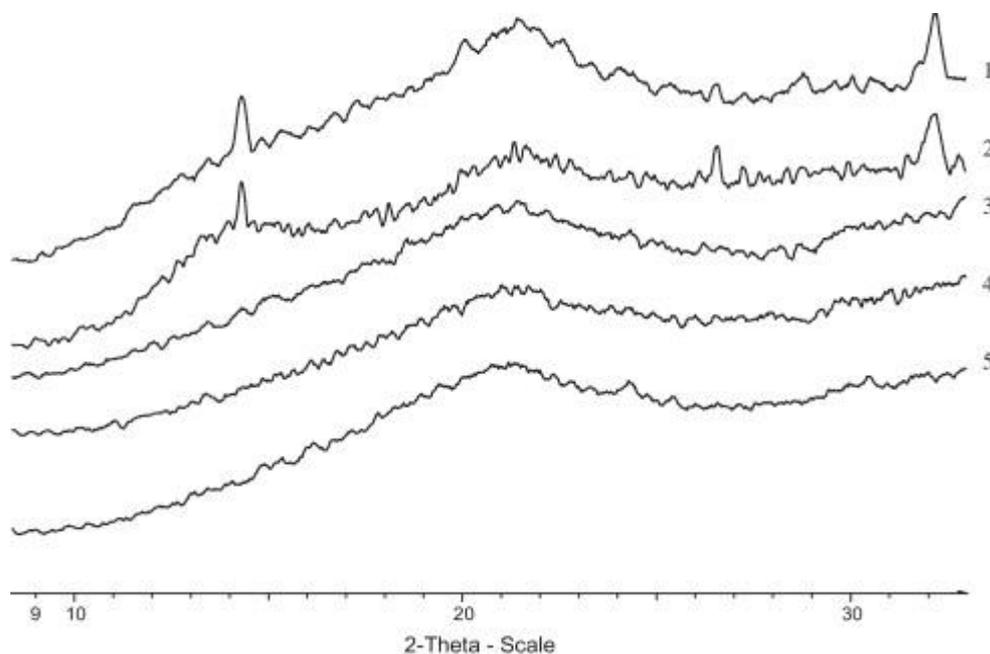
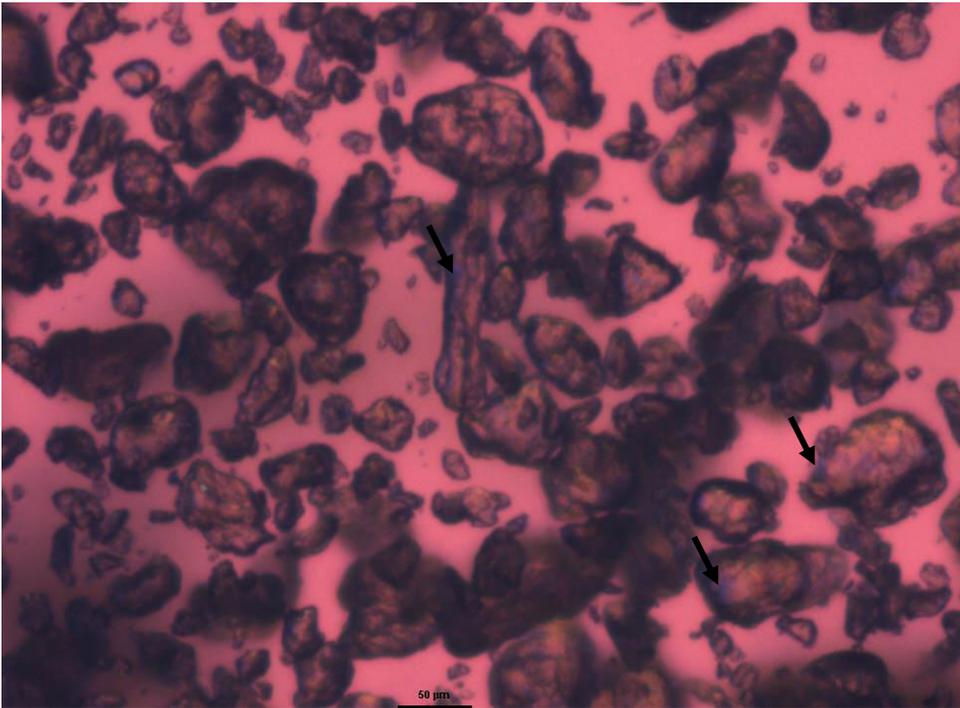


Figure : 35: Diffractogrammes de la pectine de betterave (1), pectine de betterave déestérifiée (2), hydrolysats 2 min (3), hydrolysats 5 min (4) et hydrolysats 15 min (5).

En outre, une analyse par microscopie optique sous lumière polarisée des échantillons de pectine et des POS a été également effectuée pour confirmer ou infirmer la présence de cristaux dans les échantillons. C'est une technique qui permet l'observation d'objets biréfringents anisotropes. Ainsi un objet biréfringent apparaît plus ou moins lumineux, voire de couleurs différentes dépendant du déphasage entre les deux rayons. Les images des échantillons sont représentées par les figures 36, 37 et 38.

a)



b)

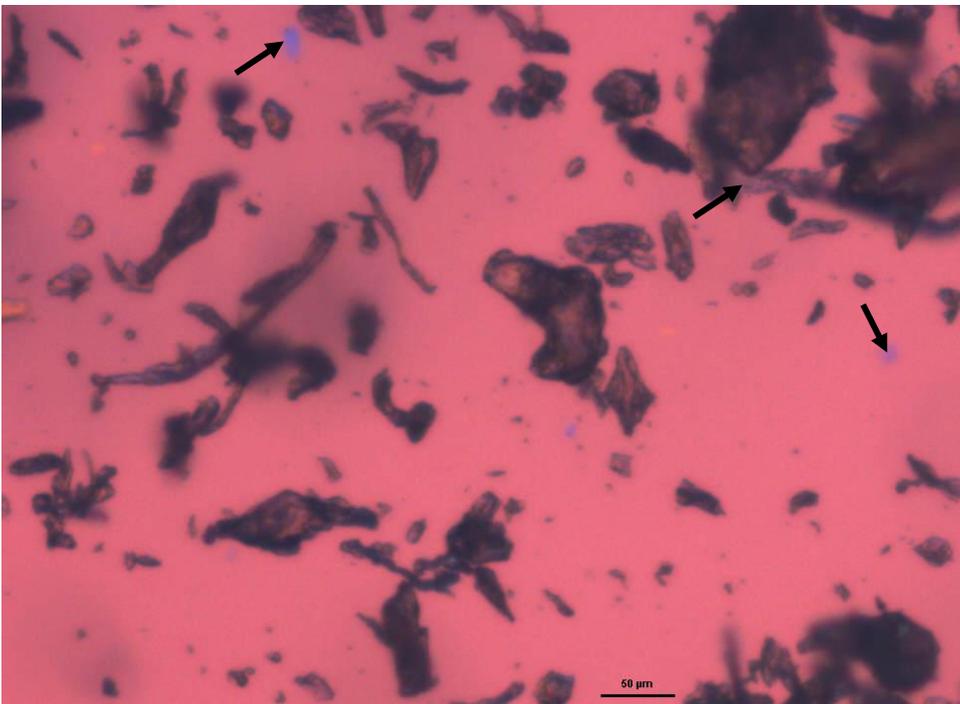
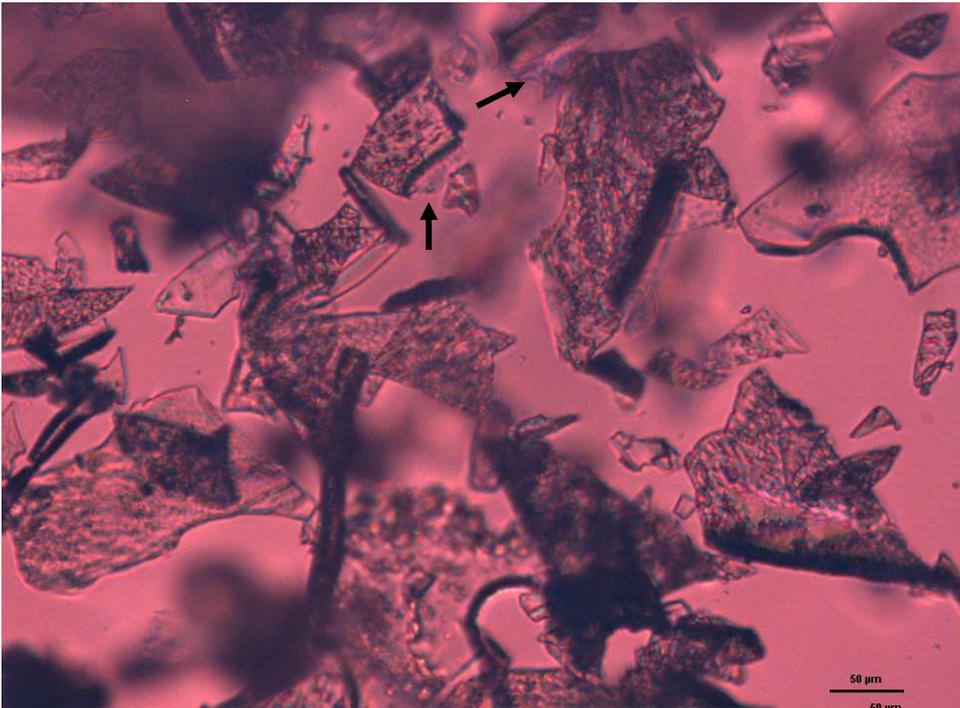


Figure 36: Imagerie par microscopie optique sous lumière polarisée des échantillons de pectines et POS avec (a) pectine de betterave, (b) pectine de betterave déacétylée. Les flèches sur les images indiquent quelques zones cristallines (Trait = 50 μm).

a)



b)

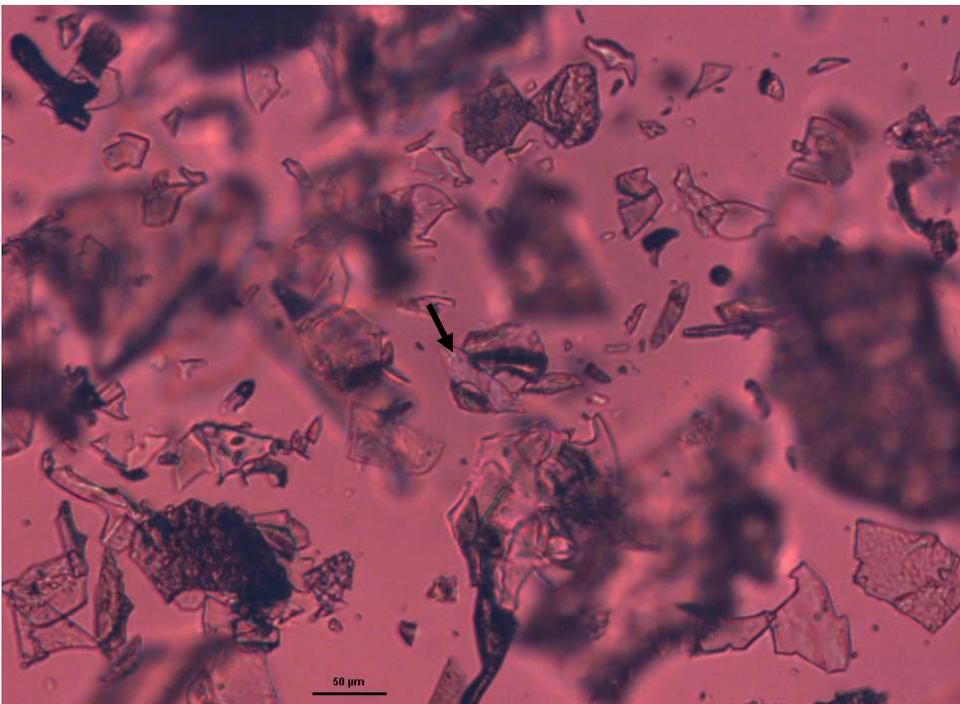


Figure 37: Imagerie par microscopie optique sous lumière polarisée des hydrolysats avec (a) hydrolysat 2 min, (b) hydrolysat 5 min. Les flèches sur les images indiquent quelques zones cristallines (Trait = 50 μm).

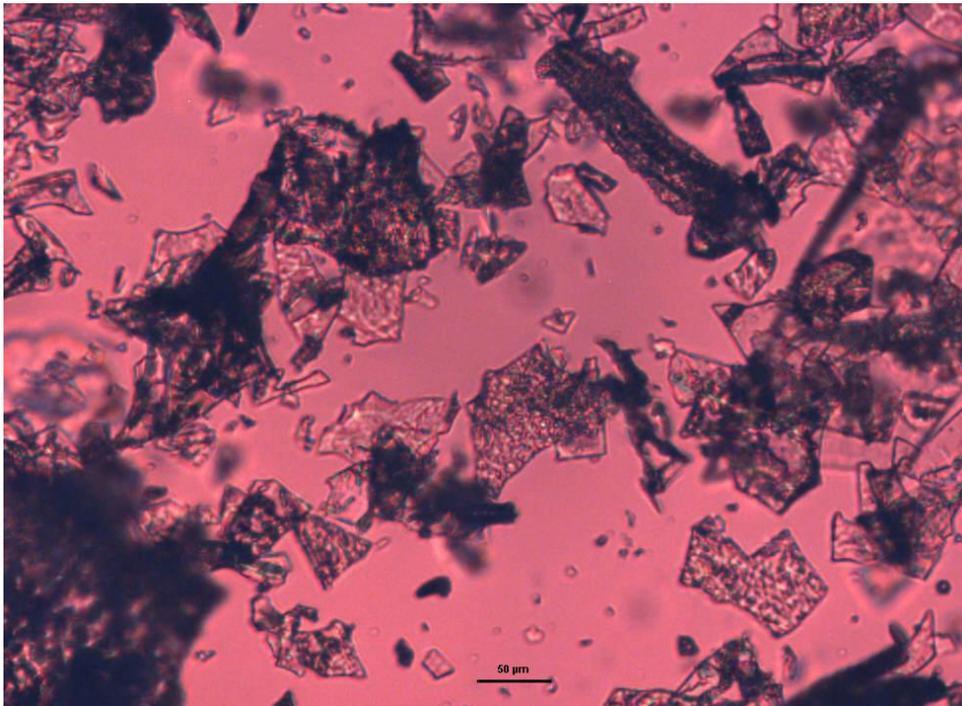


Figure 38: Imagerie par microscopie optique sous lumière polarisée de l'hydrolysate 15 min (Trait = 50 μm).

Les observations au microscope optique des échantillons mettent en relief la présence de particules cristallines dans les échantillons de pectine tandis que dans les hydrolysats, la présence de cristaux est moins perceptible. L'analyse par diffraction des rayons X et celle fournie par la microscopie optique à lumière polarisée donnent des résultats similaires. Ainsi, le traitement subit par les POS leur fait perdre en partie leur cristallinité. Il est donc possible de supposer que les POS présentent des cristaux de qualités différentes.

Les POS amorphes ainsi obtenus pourraient être appliqués dans les processus de séchage (atomisation, tambour de séchage) comme auxiliaires de séchage par atomisation pour les arômes et les assaisonnements, comme agents de support pour produire des poudres alimentaires (poudre de sauce, poudre de jus de fruits), comme substituts de matières grasses, et comme agents gonflants en raison de leurs propriétés physiques, telles que la solubilité élevée dans l'eau, la viscosité et la stabilité (Marchal *et al.*, 1999).

III.1.2.5. Conclusion

Il ressort globalement de cette étude que la dégradation de la pectine de betterave par hydrolyse enzymatique au moyen d'une endopolygalacturonase associée à une pectinéméthylestérase a permis de produire des POS. Les propriétés structurales et thermiques des POS ainsi préparés ont été examinées. Les profils HPLC des POS ont révélé la présence de quatre populations et aucune différence n'a été observée en termes de composition des oligosaccharides. Au regard des analyses thermiques, il apparaît que l'hydrolyse enzymatique de la pectine de betterave conduit à une légère diminution de la stabilité thermique et à un état amorphe des hydrolysats qui ne possèdent pas de Tg détectable. En revanche, l'analyse des produits gazeux émis ne montre aucun changement majeur dans les groupes fonctionnels avant et après hydrolyse. Ces résultats constituent un point de départ important pour la caractérisation des POS en vue de l'utilisation de ces produits dans un certains nombre d'application.

Dans la suite de ces travaux, une nouvelle voie de bioconversion des constituants polysaccharidiques a été envisagée en faisant appel aux micro-ondes. Toujours dans le registre de production d'oligosaccharides, les effets du réacteur micro-ondes sur les hydrates de carbone tels que le lévane (De Paula *et al.*, 2008), les gommés (Singh *et al.*, 2009) ont été étudiés. Ces données nous ont conduit à porter notre choix sur cette technologie dans la suite du travail.

III.2. Production de POS par traitement thermique (micro-onde) de la pectine de betterave et leur caractérisation

La valorisation des oligosaccharides issus de matières premières renouvelables fait actuellement l'objet de recherches intensives. Dans ce contexte, un grand intérêt est porté sur le développement de méthodes pour la production d'oligosaccharides. Les deux grandes voies généralement utilisées dans la production des oligosaccharides sont les voies chimique et enzymatique. Récemment, le micro-ondes est devenu un outil utile dans les synthèses organique et inorganique. L'application des micro-ondes en chimie organique pour l'extraction de composés organiques (Mandal *et al.*, 2007), dans le procédé d'extraction de pectine à partir de peaux d'orange (Zhongdong *et al.*, 2006), dans la solubilisation de polysaccharide de Soja (Tsubaki *et al.*, 2009) et dans le prétraitement de la biomasse lignocellulosique (Aguedo *et al.*, 2013) a été rapporté. La production d'arabinoxyloligosaccharides féruloylés à partir de son de maïs (Rose et Inglett, 2010) et d'oligofructane à partir de lévane (De Paula *et al.*, 2008) offre une nouvelle approche importante pour produire les oligosaccharides et donc suscite un intérêt croissant. Les principaux avantages des micro-ondes sont l'amélioration des vitesses de réaction et des rendements, un gain de temps, un chauffage uniforme par rapport au chauffage classique et aussi facile d'utilisation (Li *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation de solvants peut être évité lors d'une réaction au micro-ondes, ce qui est important pour un chauffage plus respectueux de l'environnement. En outre, l'application des micro-ondes à l'échelle laboratoire a le potentiel pour être étendu à de plus grandes échelles.

L'objectif dans cette partie du travail, est de tester les potentialités du réacteur micro-ondes pour la production de POS. Cette étude a été menée à l'aide d'un plan expérimental pour évaluer l'effet de la température, de la durée du traitement et du pH sur la production de POS et d'acide galacturonique, ce qui permettra de sélectionner des conditions conduisant à une production optimale de POS avec une concentration limitée en acide galacturonique. Les conditions expérimentales sont décrites au paragraphe (II.2.3.2.2). La détermination de la masse moléculaire, le calcul du facteur de sévérité combiné qui prend en compte les trois facteurs testés, la quantification en oligogalacturonides, en acide galacturonique et des produits de dégradation ont été réalisés par la même occasion.

III.2.1. Influence des conditions du traitement sur la masse moléculaire des produits

Le suivi de la distribution des masses moléculaires des produits réalisé par HPSEC et le calcul des facteurs de sévérité combiné ($\text{LogR}'0$) des différents traitements sont présentés dans le tableau 17. La distribution des masses moléculaires des produits de la réaction est fortement affectée par les conditions du traitement. Les produits obtenus présentent des masses moléculaires comprises entre 4,3 et 28,6 kDa. Cependant, la diminution de la masse moléculaire est plus marquée pour des températures supérieures ou égales à 160 °C et à pH 3. En effet, au pH le plus acide, la dégradation des chaînes d'acide galacturonique et des chaînes latérales de sucres neutres des pectines est accélérée (Garna *et al.*, 2004). Les produits E7 et E12 de faibles M_w , correspondent à des oligosaccharides composés de 24 à 25 unités.

L'influence du pH sur la répartition des masses moléculaires en fonction de la sévérité du traitement a été étudiée. La figure 39 présente la distribution de masse des échantillons après traitement en fonction du facteur de sévérité combiné. L'analyse de la figure montre que la masse moléculaire diminue avec la sévérité du traitement. Aussi, l'hydrolyse acide a une incidence sur la diminution de la M_w . Les échantillons montrent une plus grande susceptibilité à la dégradation à pH 3 qu'aux pH 5 et 7.

Tableau 17: Facteurs de sévérité combiné calculés et masse moléculaire déterminée pour chaque essai.

Expériences	Température (°C)	Temps (min)	pH	Facteur de sévérité combiné ($\text{LogR}'0$)	M_w (kDa)
E6	140	10	3	-0,82	8,47
E11	160	5	3	-0,53	6,63
E12	160	15	3	-0,06	4,29
E7	180	10	3	0,36	4,54
E2	140	5	5	-3,12	28,60
E4	140	15	5	-2,65	15,10
E1	160	10	5	-2,23	7,95
E8	160	10	5	-2,23	7,38
E15	160	10	5	-2,23	7,64
E3	180	5	5	-1,95	7,53
E5	180	15	5	-1,47	7,32
E9	140	10	7	-4,82	19,60
E13	160	5	7	-4,53	9,17
E14	160	15	7	-4,06	8,13
E10	180	10	7	-3,65	9,29

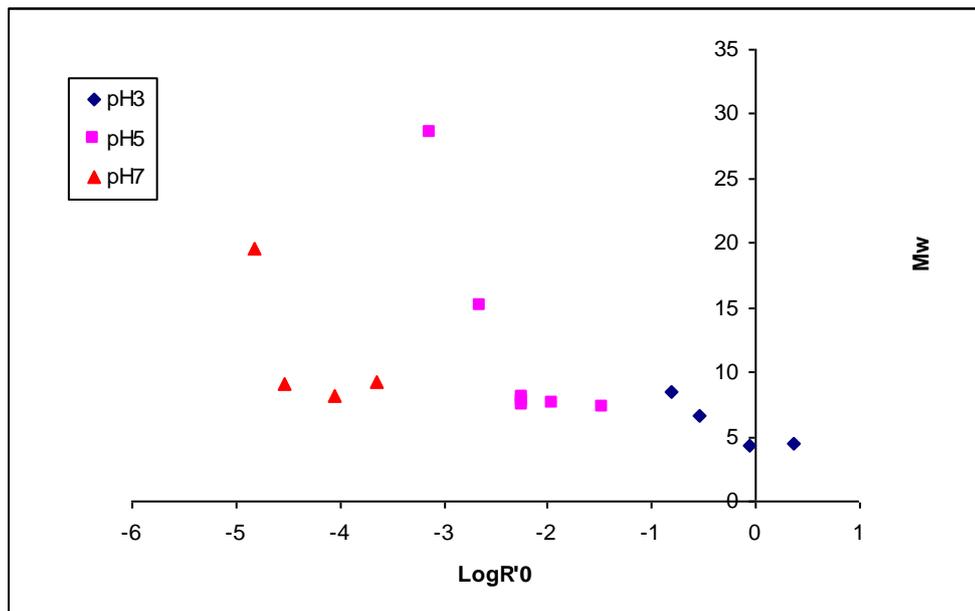


Figure 39: Distribution de la masse moléculaire des échantillons obtenus par traitement micro-ondes de la pectine de betterave en relation avec le facteur de sévérité combiné et le pH.

III.2.2. Effet des conditions du traitement sur la composition en oligosaccharides

Les hydrolysats obtenus par traitement micro-ondes ont été analysés par HPAEC-PAD. L'hydrolysat d'acide polygalacturonique (paragraphe II.2.3.2.1) a été utilisé comme référence pour identifier les produits de dégradation de la pectine de betterave. Le profil chromatographique de quelques hydrolysats est présenté à la figure 40, 41 et 42.

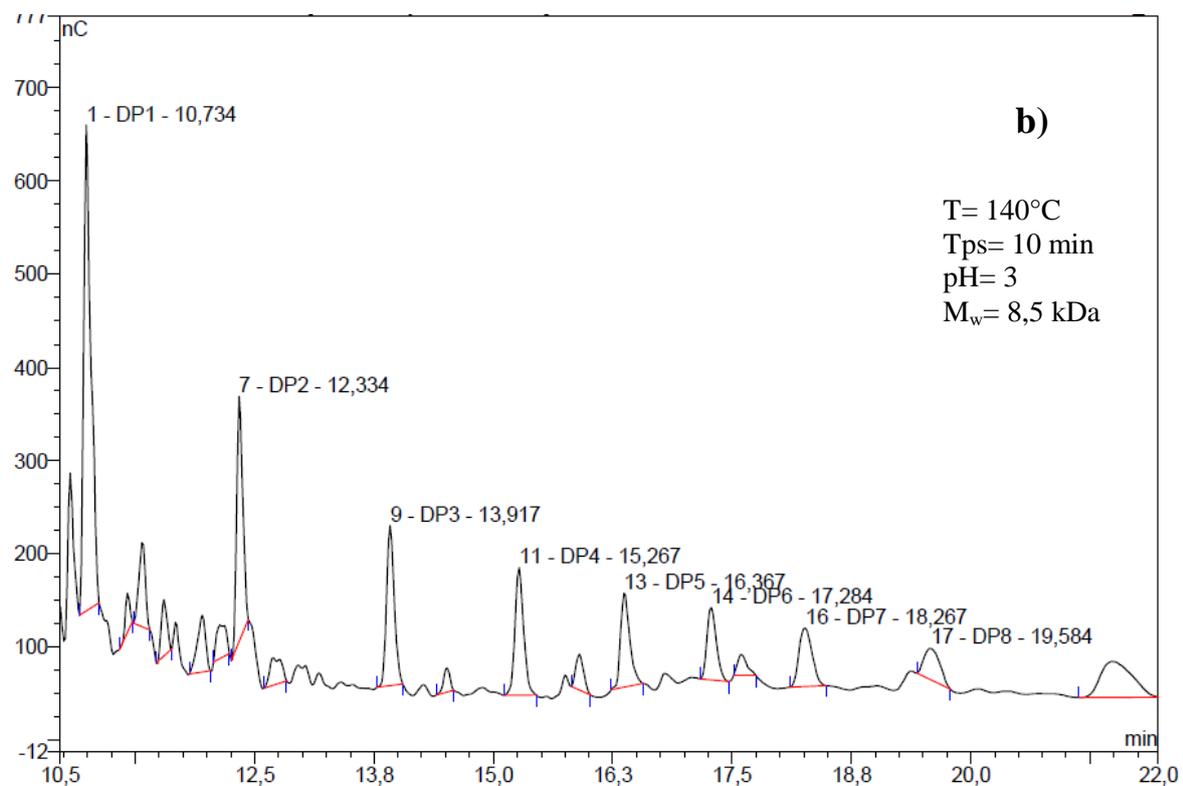
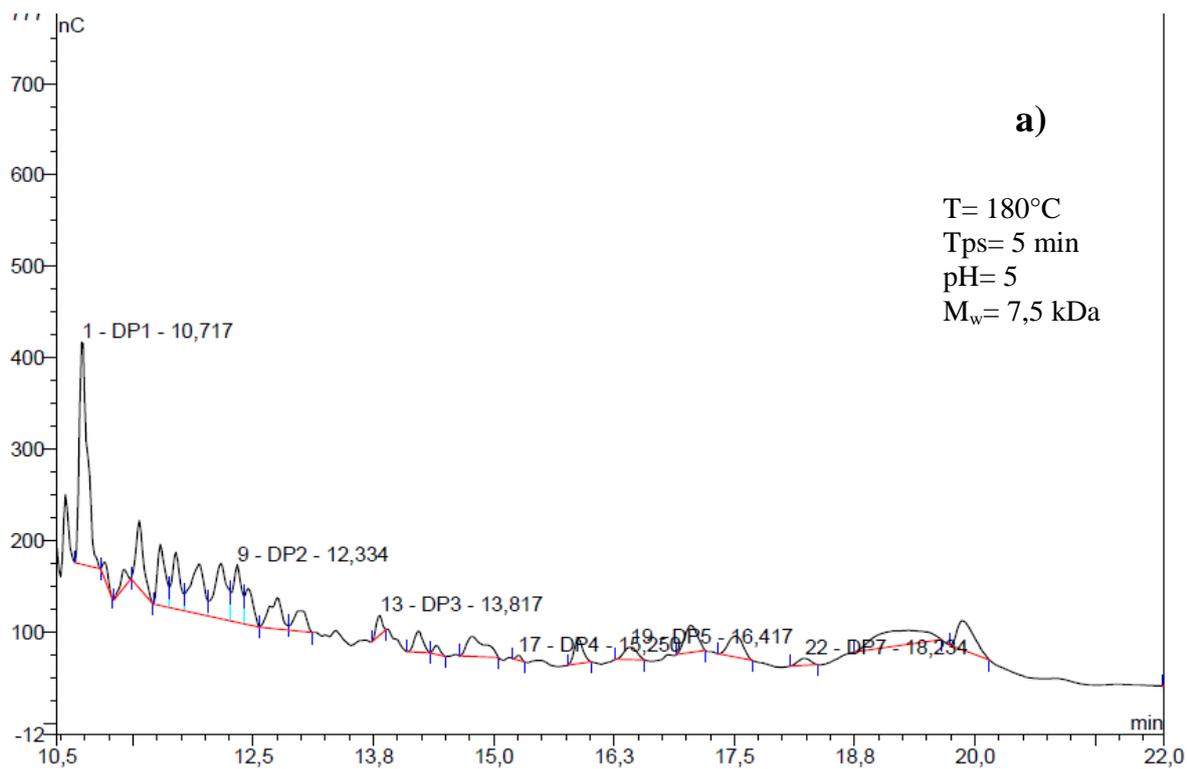


Figure 40: Profils chromatographiques de quelques hydrolysats obtenus avec a correspondant à l'essai E3 et b l'essai E6.

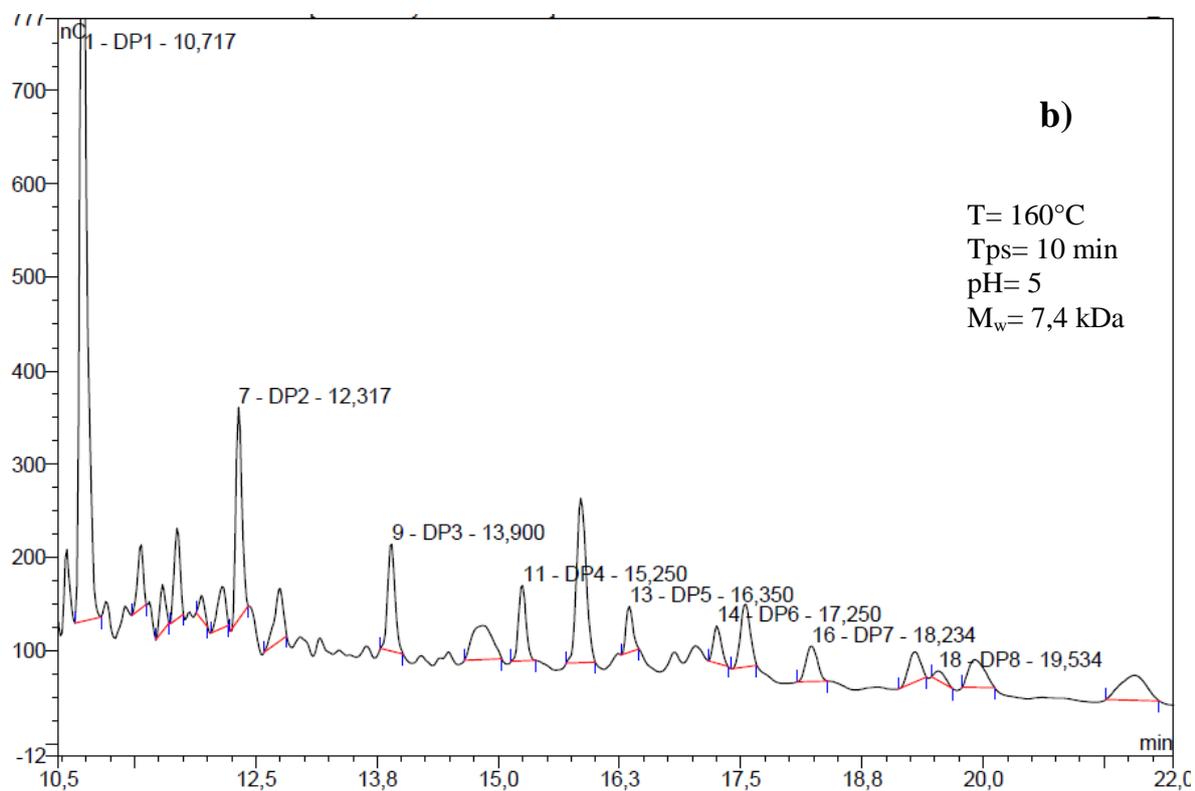
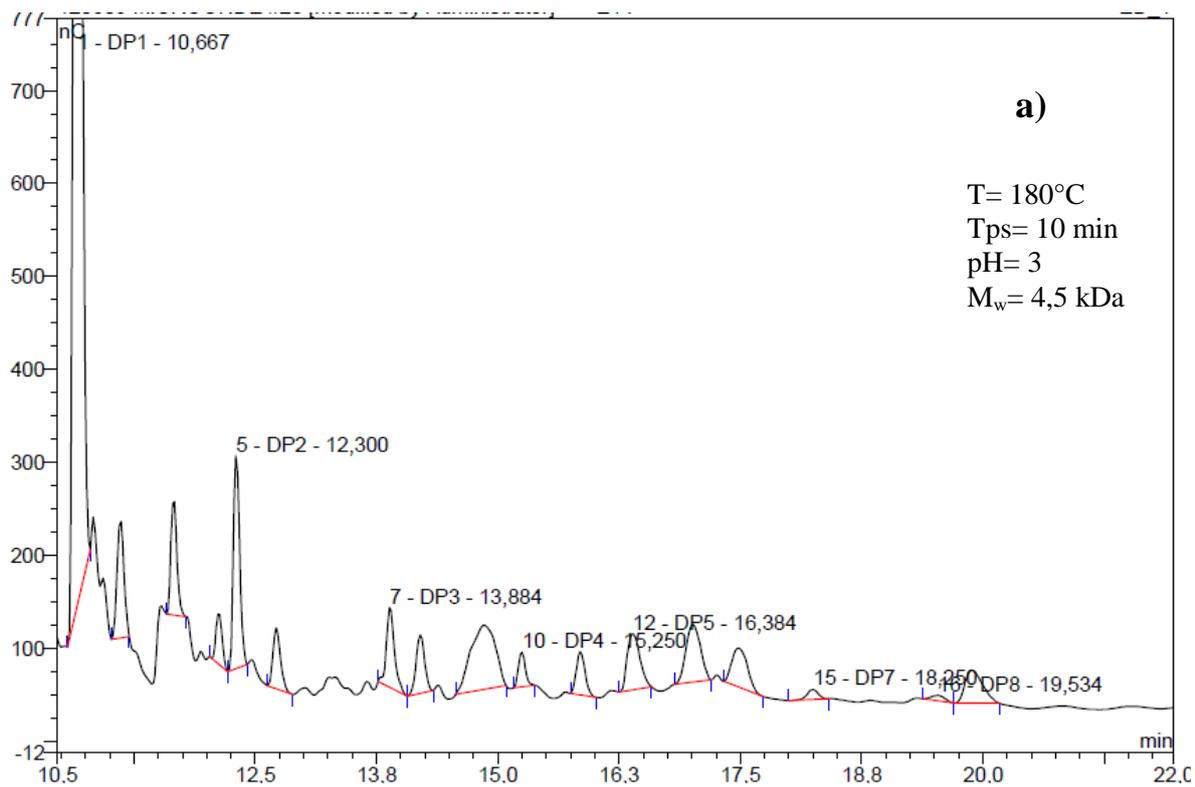


Figure 41: Profils chromatographiques de quelques hydrolysats obtenus avec a correspondant à l'essai E7 et b l'essai E8.

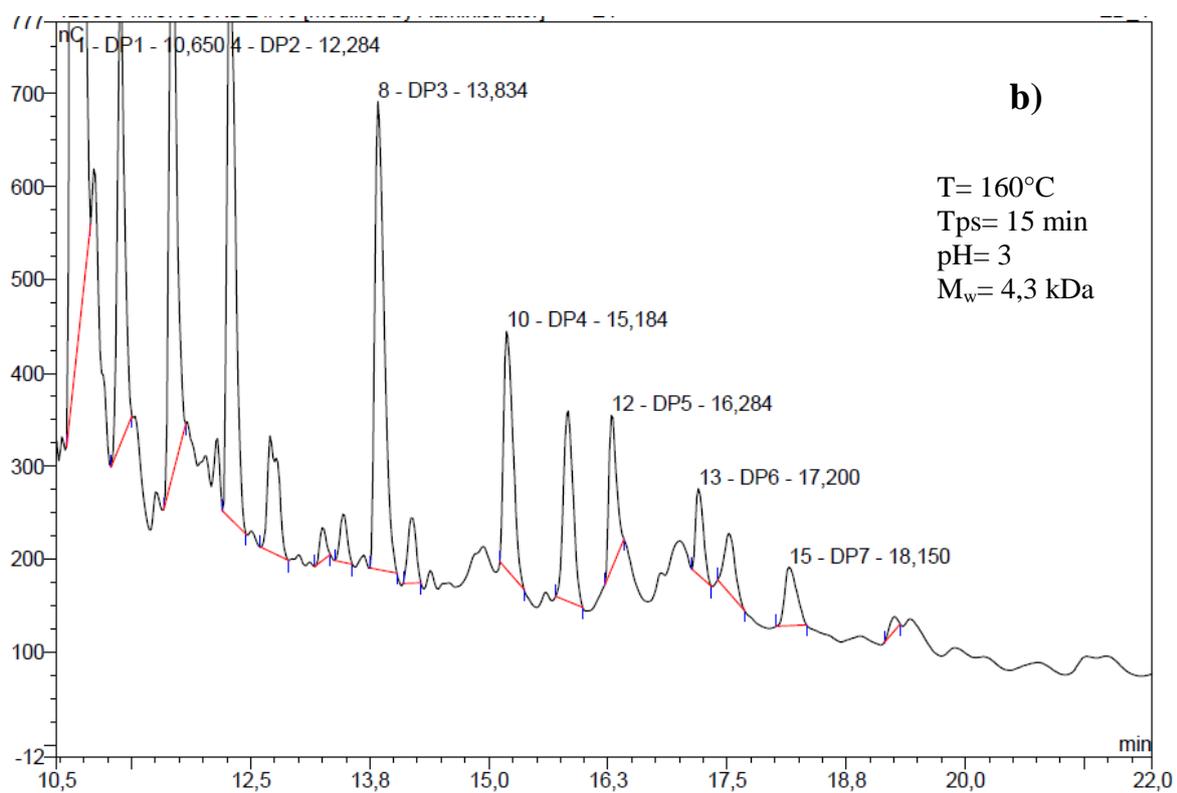
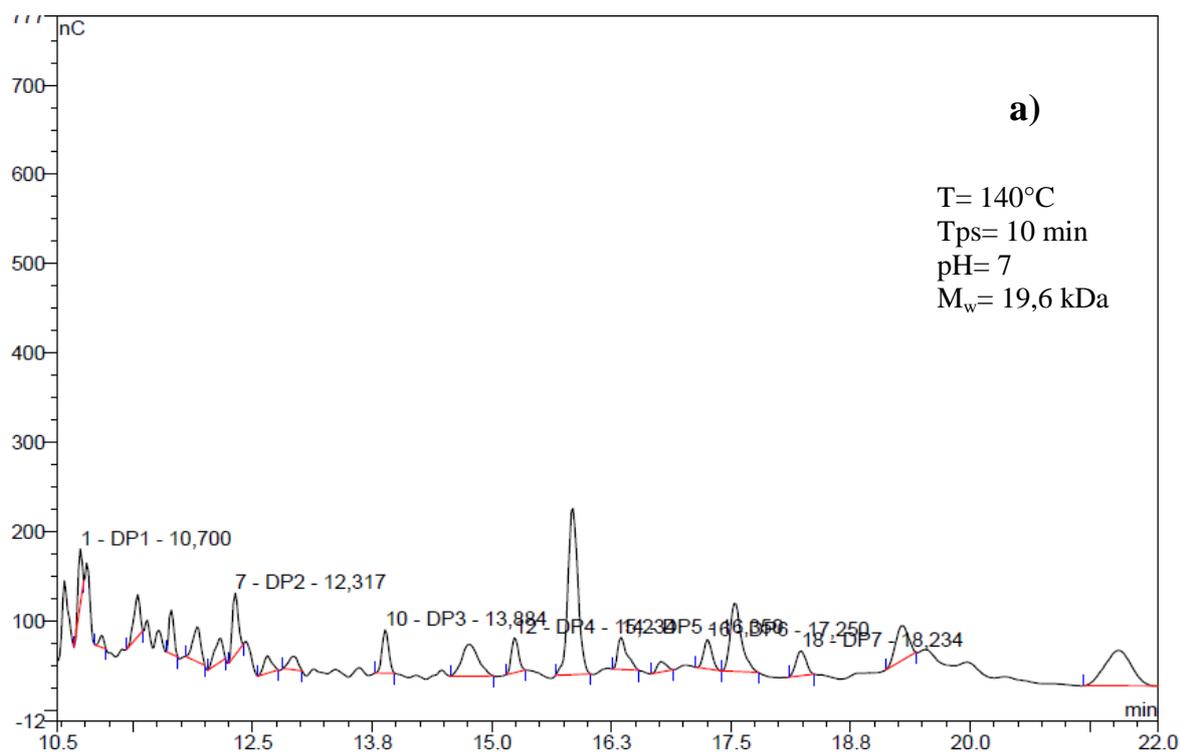


Figure 42: Profils chromatographiques de quelques hydrolysats obtenus avec a correspondant à l'essai E9 et b l'essai E12.

La surface des oligogalacturonides DP1 à DP8 dérivée des profils HPAEC-PAD ci-dessus est présentée dans le tableau 18.

Tableau 18: Surface des pics des différents oligogalacturonides obtenus des essais E3, E6, E7, E8, E9 et E12.

Expériences	Surfaces (nC*min)							
	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
E3	23,52	6,03	1,52	0,31	2,11	/	1,14	/
E6	45,63	19,37	16,10	14,30	11,23	8,82	9,98	6,48
E7	180,70	17,35	8,17	3,04	9,17	/	1,41	0,95
E8	71,69	16,27	10,04	7,04	3,97	3,72	5,16	1,35
E9	2,67	4,78	3,85	3,26	4,10	3,29	3,78	/
E12	366,71	61,84	56,98	28,88	14,72	8,69	9,13	/

L'analyse des profils chromatographiques (Figures 40, 41 et 42) montre l'influence des conditions du traitement sur la distribution des oligosaccharides dans les produits. Pour tous les essais réalisés, une corrélation entre les profils de dégradation et la composition des produits est observée. Les conditions sévères du traitement conduisent à une dégradation plus importante de la pectine de betterave en acide galacturonique (Figures 41a et 42b). Le tableau 18 met nettement en évidence l'influence des conditions de traitement sur les valeurs de surface obtenues. En plus des oligomères d'acide galacturonique, d'autres pics non identifiés sont visibles sur les chromatogrammes, correspondant vraisemblablement à des oligosaccharides de structures différentes. La présence de toutes ces molécules suggère que la dégradation de la pectine de betterave par traitement micro-ondes se produit au travers de ruptures aléatoires des liaisons glycosidiques au sein de la molécule.

III.2.3. Effet des conditions du traitement sur la production d'acide galacturonique et de POS

L'effet de la variation de la température, de la durée du traitement et du pH sur la production d'acide galacturonique et de POS a été investigué dans cette partie du travail. Pour cela le plan expérimental de Box-Behnken décrit au paragraphe II.2.3.2.2.2 a été utilisé. Ce plan

permet d'étudier l'effet linéaire, quadratique et les interactions des trois facteurs cités précédemment et consiste en la réalisation de 15 essais totalement randomisés avec 3 points centraux. Chaque facteur à trois niveaux -1, 0 et 1 qui correspondent aux niveaux bas, moyen et haut. Le tableau 19 présente le plan expérimental et les niveaux des facteurs en termes de valeurs expérimentales et valeurs codées auxquelles les expériences ont été menées.

Les concentrations en acide galacturonique et en POS dans les différents échantillons ont été calculées d'après les données HPSEC-RI. Elles sont exprimées en milligramme par gramme de pectines. Les valeurs de concentration en acide galacturonique et en POS observées et prédites par le plan expérimental de Box-Behnken pour chaque essai sont reportées dans le tableau 19. L'analyse des résultats montre que de manière globale, il n'y a pas de grande différence entre les valeurs observées et prédites. En ce qui concerne les concentrations en acide galacturonique et en POS, l'amplitude de variation des valeurs obtenues suivant les conditions appliquées est importante, variant de 0,34 à 47,3 mg/g et de 24,9 à 702,3 mg/g respectivement.

Tableau 19: Valeurs expérimentales et prédites de la concentration en acide galacturonique et oligogalacturonides obtenues par l'application du plan de Box-Behnken pour les trois facteurs.

Expériences	Valeurs expérimentales			Valeurs codées			Concentration en mg/g			
	Température	Temps	pH	Température	Temps	pH	Valeurs observées		Valeurs prédites	
							AGA	OligoAGA	AGA	OligoAGA
E1	160	10	5	0	0	0	9,346	242,994	8,375	240,635
E2	140	5	5	-1	-1	0	0,427	337,880	-4,126	311,025
E3	180	5	5	1	-1	0	2,829	54,998	1,194	43,968
E4	140	15	5	-1	1	0	3,558	391,752	5,193	402,782
E5	180	15	5	1	1	0	6,888	24,923	11,442	51,778
E6	140	10	3	-1	0	-1	5,880	441,954	10,349	510,303
E7	180	10	3	1	0	-1	23,284	115,154	24,834	167,679
E8	160	10	5	0	0	0	9,238	236,482	8,375	240,635
E9	140	10	7	-1	0	1	0,344	364,610	-1,206	312,085
E10	180	10	7	1	0	1	0,348	104,997	-4,121	36,648
E11	160	5	3	0	-1	-1	18,183	381,805	18,267	340,310
E12	160	15	3	0	1	-1	47,252	702,354	41,148	622,975
E13	160	5	7	0	-1	1	5,006	329,187	11,109	408,567
E14	160	15	7	0	1	1	7,880	183,975	7,796	225,469
E15	160	10	5	0	0	0	6,541	242,430	8,375	240,635

III.2.3.1 Analyse statistique des réponses expérimentales : cas de l'acide galacturonique

III.2.3.1.1 Modèle de régression

En appliquant l'analyse de régression multiple sur les données expérimentales, l'équation polynomiale de second ordre décrivant l'influence de la température (T), du temps (tps) et du pH sur la libération d'acide galacturonique est représentée par l'équation ci-dessous.

$$\text{AGA (mg/g)} = 8,375 + 2,892T + 4,892\text{tps} - 10,128\text{pH} + 0,232T \times \text{tps} - 4,350T \times \text{pH} - 6,549\text{tps} \times \text{pH} - 8,533T^2 + 3,583\text{tps}^2 + 7,621\text{pH}^2$$

(Eq. 13)

Les résultats de l'analyse de variance à $P < 0,05$, des moyennes et des écarts types obtenus pour la libération d'acide galacturonique sont présentés dans le tableau 20. Ce test de l'analyse de variance permet de tester l'existence d'effet significatif des facteurs évalués sur la production d'acide galacturonique.

Tableau 20: Analyse de variance du modèle liant la concentration en acide galacturonique aux différents paramètres expérimentaux appliqués.

Source	SC	DL	CM	F	P
Modèle	1857,055	9	206,339	6,028	0,030
Température	66,929	1	66,929	26,50	0,0357*
Temps	191,425	1	191,425	75,80	0,0129*
pH	820,532	1	820,532	324,93	0,0031*
Température ²	268,829	1	268,829	106,46	0,0093*
Température×Temps	0,215389	1	0,215389	0,09	0,7978 ^{ns}
Température×pH	75,69	1	75,69	29,97	0,0318*
Temps ²	47,4101	1	47,4101	18,77	0,0494*
Temps×pH	171,541	1	171,541	67,93	0,0144*
pH ²	214,483	1	214,483	84,94	0,0116*
Résiduels	171,16	5	34,231		
Lack of fit	166,104	3	55,3682	21,93	0,0439 ^{ns}
Erreur pure	5,051	2	2,52525		
Total Corrigé	2070,53	14			
R ²		0,917			
R ² adj		0,769			

SC : somme des carrés, DL : degré de libertés, CM : carré moyen, F : test de Fisher, P : probabilité, * : significatif ($P < 0,05$), ns : non significatif

Ces résultats montrent que les trois facteurs évalués (Température, Temps et pH) décrivant les termes linéaires du modèle ont un effet significatif ($P < 0,05$) sur la production d'acide galacturonique. De même, tous les termes quadratiques (Température², Temps² et pH²) ont un effet significatif ($P < 0,05$). Au niveau des interactions entre les facteurs, les résultats expérimentaux montrent que seule l'interaction Température×Temps n'est pas significative ($P > 0,05$). Un paramètre est d'autant plus significatif que la valeur de F est élevée et la valeur de P faible. La valeur du coefficient de détermination R^2 égale à 0,917 indique que les concentrations en acide galacturonique obtenues (Tableau 20), sont expliquées de façon satisfaisante par le modèle, soit 91,7% de la variabilité de la réponse peut être prédite par le modèle. La probabilité obtenue pour le manque d'ajustement (Lack of fit) est inférieure au seuil de signification choisi (5% dans notre cas). Il est donc statistiquement significatif. Cela signifie qu'il existe statistiquement des variabilités qui ne sont pas expliquées par les facteurs et leurs interactions.

La figure 43 présente le diagramme de Pareto qui montre, à partir des données obtenues de l'analyse de variance, les effets estimés sur une variable donnée par ordre d'importance. La ligne verticale ajoutée sur le diagramme de Pareto construit par le logiciel StatGraphics permet d'apprécier les effets significatifs. Ainsi, les barres qui dépassent cette ligne correspondent à des effets significatifs au seuil de 5%. Une valeur positive de l'effet estimé indique une augmentation de la réponse si la variable augmente à son niveau haut tandis qu'une valeur négative indique une augmentation de la réponse si la variable diminue à son niveau bas.

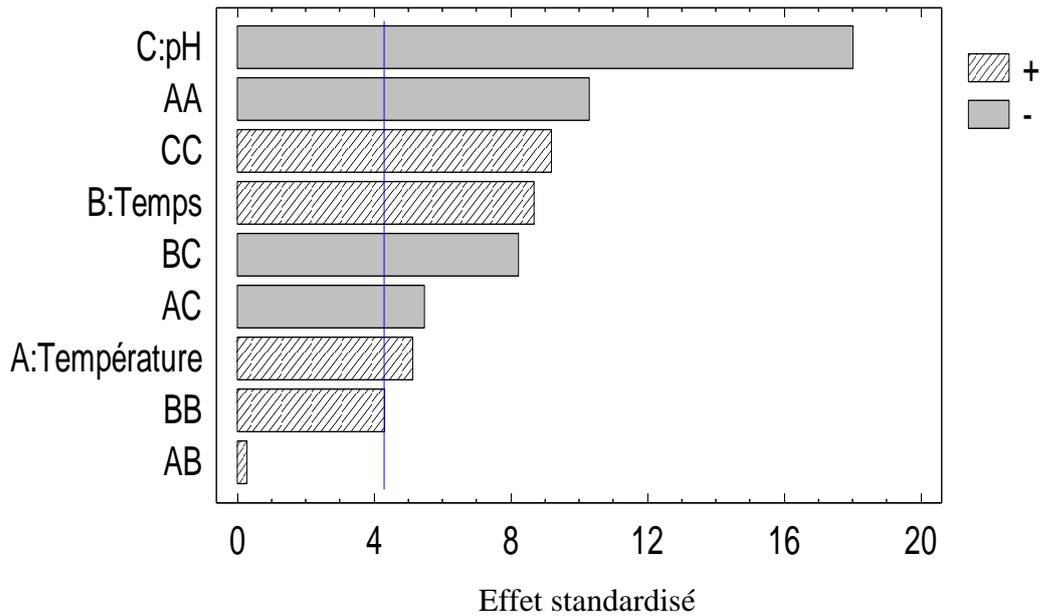


Figure 43: Diagramme de Pareto représentant les effets de la température, du temps et du pH sur la quantité d'acide galacturonique libérée.

Le diagramme de Pareto ainsi présenté (Figure 43) classe les effets des variables : pH, temps et température et leurs interactions en fonction de leur influence sur la production d'acide galacturonique. La libération d'acide galacturonique est plus influencée par le pH que par le temps, la température et leurs interactions. L'intervention significative du pH est négative, cela veut dire que l'augmentation du pH contribue à une diminution de la production d'acide galacturonique. Les deux autres facteurs interviennent positivement avec une production d'acide galacturonique qui augmente avec le temps et la température.

La figure 44 représente le graphique des effets principaux sur la concentration en acide galacturonique. Cette figure permet de voir les résultats d'une façon un peu plus quantifiée.

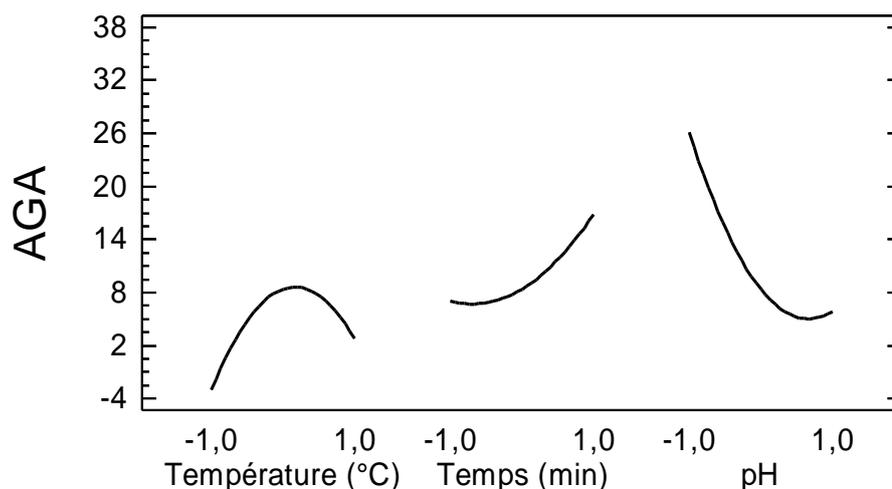


Figure 44: Graphique des effets des différents paramètres testés, sur la quantité d'acide galacturonique (mg/g) libérée.

D'après la figure 44, le pH est le principal facteur qui influence la production d'acide galacturonique devant la température et le temps d'hydrolyse. L'hydrolyse obtenue à pH -1,0 (3) contient plus d'acide galacturonique que celle obtenue à pH 1,0 (7), confirmant ainsi ce qui a été dit plus haut sur l'effet de l'intervention négative du pH sur la teneur en acide galacturonique (Figure 43). En effet, en milieu neutre et à température élevée, deux réactions se produisent au sein des pectines. Elles subissent des désestérifications et des dépolymérisations par β -élimination (Renard et Thibault, 1996). La différence d'acide galacturonique observée entre le pH 3 et le pH 7 pourrait s'expliquer par le fait que déjà à pH 7 et avant la montée en température, la réaction de désestérification a lieu. Or, la β -élimination se produisant au niveau des résidus d'acide galacturonique méthylé, il y a donc inhibition de cette réaction par la désestérification. En outre, une augmentation de la durée du traitement a un effet positif sur la libération d'acide galacturonique lors du passage du niveau -1 (5 min) au niveau 1 (15 min). La température quant à elle n'a que peu d'influence sur la libération d'acide galacturonique.

III.2.3.1.2 Analyse des surfaces de réponses

Les courbes des contours de surface montrant la relation entre les différentes variables opératoires et la réponse étudiée ont été réalisées. Ces courbes sont illustrées à la figure 45.

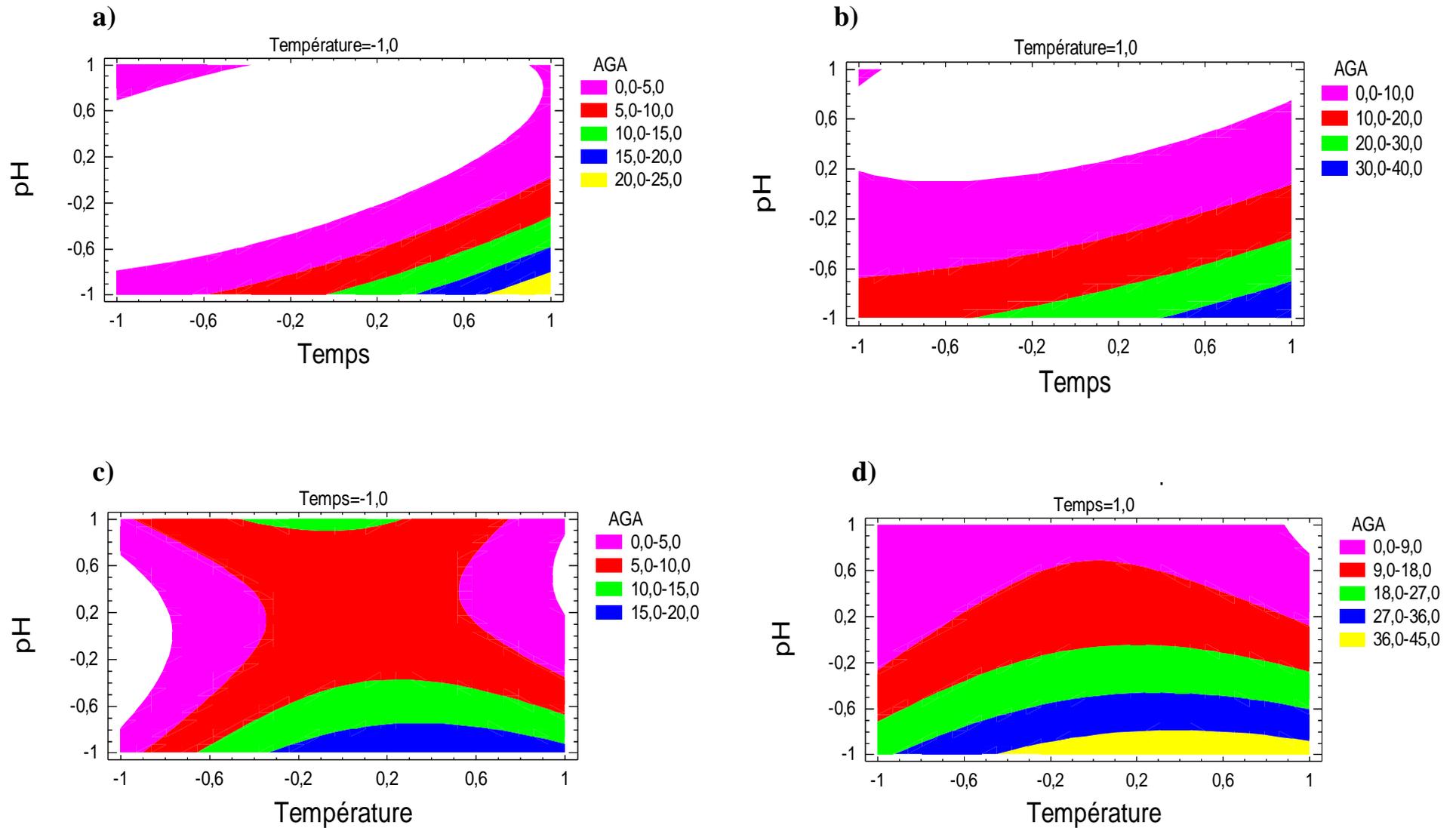


Figure 45: Courbes de contour montrant l'effet prédit de la température, du temps et du pH (en valeurs codées) sur la libération d'acide galacturonique. Lors de chaque variation de paramètre, le 3^{ème} paramètre est maintenu soit à son niveau bas (a, c) ou niveau haut (b, d).

Comme on peut voir sur les courbes de niveau de réponses, l'effet de l'interaction entre le temps et le pH sur la concentration en acide galacturonique aux températures fixées à 140 et 180°C (Figure 45a, b) montre une augmentation de la concentration lorsque le temps du traitement augmente et quand le pH diminue. Toutefois, à température fixée à 1,0 (température = 180°C), la quantité d'acide galacturonique libérée est multipliée par deux par rapport à la température fixée à 140°C (Figures 45a et 45b).

De même, l'interaction entre la température et le pH suit le même schéma de libération pour des temps de traitement fixés à 5 et 15 min. La concentration en acide galacturonique augmente avec le temps lorsque nous passons du niveau -1 au niveau 1. Les surfaces des courbes de niveau (Figures 45c et 45d) nous indiquent que pour les valeurs de $T = 166^{\circ}\text{C}$ (ou 0,3 en valeur codée), le maximum de libération est atteint. Ainsi nous voyons nettement une région optimale de température où la concentration d'acide galacturonique est importante. La réalisation de la réaction d'hydrolyse à des températures inférieures à ces températures optimales entraînerait une diminution de la concentration d'acide galacturonique. L'analyse de ces résultats nous permet d'apprécier l'optimum de chacun des facteurs de façon à atteindre l'un de nos objectifs, à savoir limiter l'apparition d'acide galacturonique. L'emploi donc d'un pH acide (3), d'un temps de traitement en dessous de 7 min avec une température fixée à 140°C, conduira au résultat souhaité (Figure 45a, c).

III.2.3.2 Analyse statistique des réponses expérimentales : cas des POS

III.2.3.2.1 Modèle de régression

En appliquant l'analyse de régression multiple sur les données expérimentales, l'équation polynomiale de second ordre décrivant l'influence de la température, du temps et du pH sur la production des POS est présentée ci-dessous.

$$\text{OligoAGA (mg/g)} = 240,635 - 154,515T + 24,8918\text{tps} - 82,3122\text{pH} - 20,9868T \times \text{tps} + 16,7968T \times \text{pH} - 116,44\text{tps} \times \text{pH} - 90,4493T^2 + 52,2022\text{tps}^2 + 106,493\text{pH}^2$$

(Eq. 14)

L'analyse de variance pour la production de POS est présentée dans le tableau 21.

Tableau 21: Analyse de variance du modèle liant la concentration en POS aux différents paramètres testés.

Source	SC	DL	CM	F	P
Modèle	389424,98	9	43269,4	5,66	0,025
Température	191000,0	1	191000,0	14673	0,0001*
Temps	4956,79	1	4956,79	380,70	0,0026*
pH	54202,5	1	54202,5	4163,9	0,0002*
Température ²	30207,0	1	30207,0	2320,6	0,0004*
Température×Temps	1761,77	1	1761,77	135,34	0,0073*
Température×pH	1128,52	1	1128,52	86,70	0,0113*
Temps ²	10061,8	1	10061,8	772,96	0,0013*
Temps×pH	54233,3	1	54233,3	4166,3	0,0002*
pH ²	41873,3	1	4187,3	3216,8	0,0003*
Résiduels	38222,02	5	7644,4		
Lack of fit	32592,4	3	10864,1	834,60	0,0012 ^{ns}
Erreur pure	26,0343	2	13,0172		
Total Corrigé	427647,0	14			
R ²			0,924		
R ² adj			0,786		

SC : somme des carrés, DL : degré de libertés, CM : carré moyen, F : test de Fisher, P : probabilité, * : significatif (P < 0,05), ns : non significatif

Tous les termes (linéaires, quadratiques et interactions) ont un effet significatif (P < 0,05) et semblent influencer la production de POS dans la gamme des valeurs testées. La valeur du coefficient de détermination $R^2 = 0,924$ indique que les concentrations en POS obtenues (Tableau 21), sont expliquées de façon satisfaisante par le modèle, soit 92,4% de variations sont attribuées aux variables indépendantes, et seulement 7,6% de la variation totale ne peut pas être expliquée par le modèle. La probabilité obtenue pour le manque d'ajustement (Lack of fit) est inférieure au seuil de signification choisi (5% dans notre cas). Il est donc statistiquement significatif. Cela signifie que statistiquement, il existe des variabilités qui ne sont pas expliquées par les paramètres et leurs interactions.

La figure 46 présente le diagramme de Pareto qui montre, à partir des données obtenues de l'analyse de variance, les effets estimés sur une variable donnée par ordre d'importance. Ce diagramme classe les facteurs et leurs interactions en fonction de leur influence sur la production de POS.

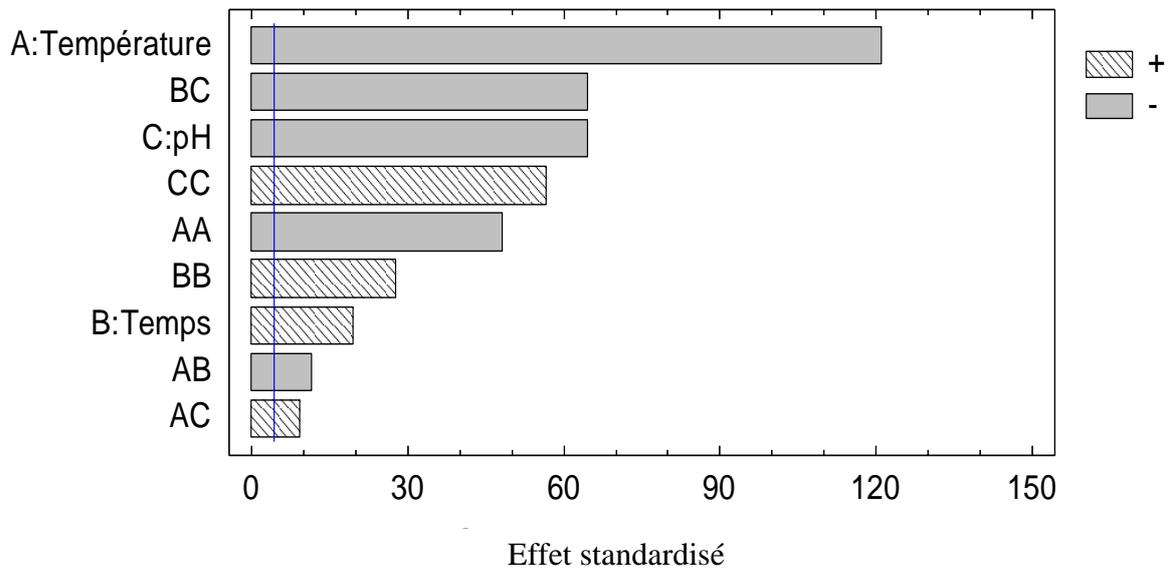


Figure 46: Diagramme de Pareto représentant les effets de la température, du temps et du pH sur la production de POS.

Contrairement à la production d'acide galacturonique, la production de POS est plus influencée par le facteur température que par les facteurs pH et temps. Par ailleurs, tous les facteurs et interactions sont significatifs car ayant un effet supérieur à la limite du seuil de signification 5% (trait vertical). L'intervention significative de la température et du pH est négative contrairement à celle du temps qui est positive. Cela veut dire que l'augmentation de la température et du pH entraîne une diminution de la production de POS tandis qu'une augmentation de la production de POS est obtenue avec une augmentation du temps d'hydrolyse.

La figure 47 présente de manière plus quantitative les principaux effets des facteurs considérés sur la concentration de POS.

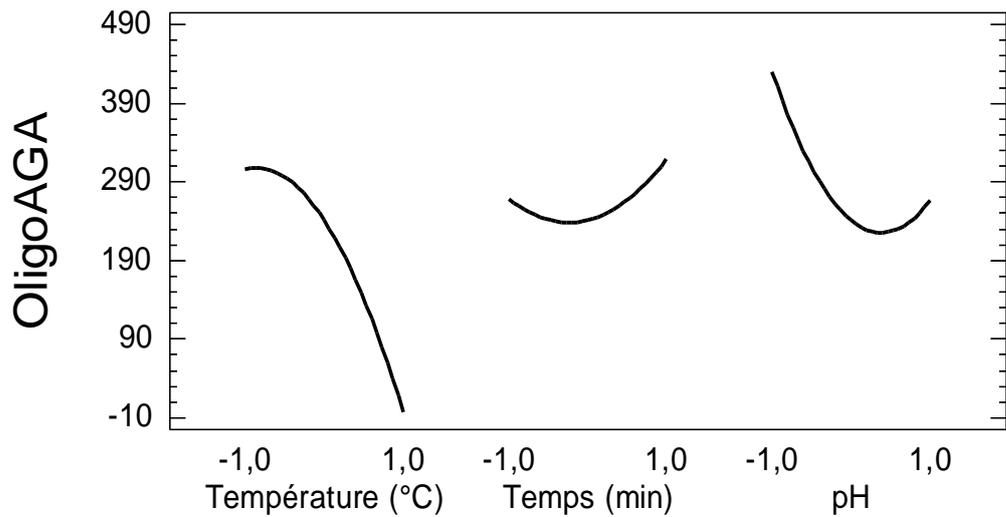


Figure 47: Graphique des effets des différents paramètres testés sur la production de POS exprimée en mg/g.

L'analyse de la figure 47 montre que la production de POS est plus influencée par la température que le pH et le temps. La teneur en POS diminue avec l'augmentation de la température. Il est également observé que la teneur en POS décroît avec l'augmentation du pH lors du passage du niveau -1 au niveau 1. L'hydrolysate obtenu à une température -1,0 (140°C) et un pH -1,0 (3) contient donc plus de POS que l'hydrolysate obtenu à une température de 1,0 (180°C) et un pH 1,0 (7). La durée du traitement quant à elle, influence de manière positive la production de POS.

III.2.3.2 Analyse des surfaces de réponses

La figure 48 représente les tracés de contour de l'effet de deux variables, à savoir la température et le pH au cours de la production de POS quand le temps du traitement est fixé à son niveau bas et haut.

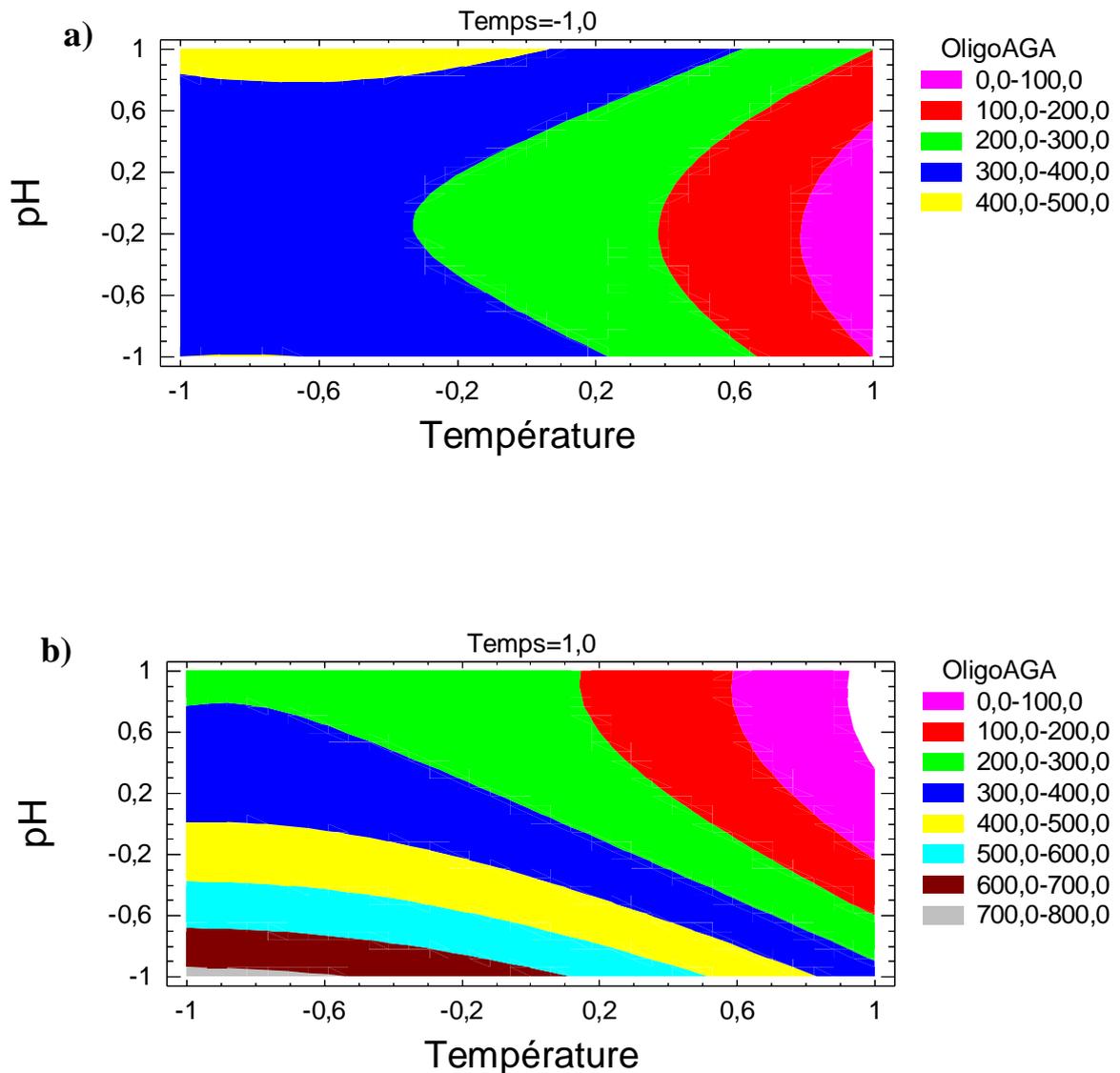


Figure 48: Courbes de contour montrant l'effet prédit de la température et du pH sur la production de POS exprimée en mg/g. Le 3^{ème} paramètre est maintenu soit à son niveau bas (a) ou niveau haut (b).

Ces résultats montrent une augmentation de la production de POS lorsque nous passons du niveau -1 au niveau 1 du temps de traitement. Cependant, à pH 3 et aux valeurs de températures comprises entre 140 et 149°C (-1 et -0,55), la concentration maximale en POS est obtenue. Donc, les conditions optimales fournies par le modèle pour maximiser la production de POS sont : une température de 140°C, un pH égal à 3 et une durée de traitement égale à 15 min.

L'analyse des conditions optimales des différentes réponses révèle une concordance entre les données. Cela paraît très intéressant dans la mesure où la libération non souhaitée d'acide galacturonique est indissociable de la production de POS. Dans ces conditions, on peut concilier la production optimale de POS à la libération limitée d'acide galacturonique.

III.2.4 Evolution de la concentration en 5-hydroxyméthyl furfural et en furaldéhyde au cours du traitement

En plus de former des oligosaccharides et des monosaccharides, le traitement des solutions de pectine par micro-ondes décrit suivant le plan expérimental, comporte le risque de formation de produits de dégradation indésirables. De tels composés pourraient influencer négativement l'utilisation des POS d'autant plus que l'un des critères de qualification des oligosaccharides est leur aptitude à être fermentés et donc la présence de tels composés dans les POS pourrait inhiber les microorganismes susceptibles de les utiliser. L'apparition de 5-hydroxyméthyl furfural (HMF) et de furaldéhyde (2-F) (Figure 49a et b) est le résultat de la transformation des sucres simples au cours du chauffage, l'acidité du milieu étant un facteur aggravant.

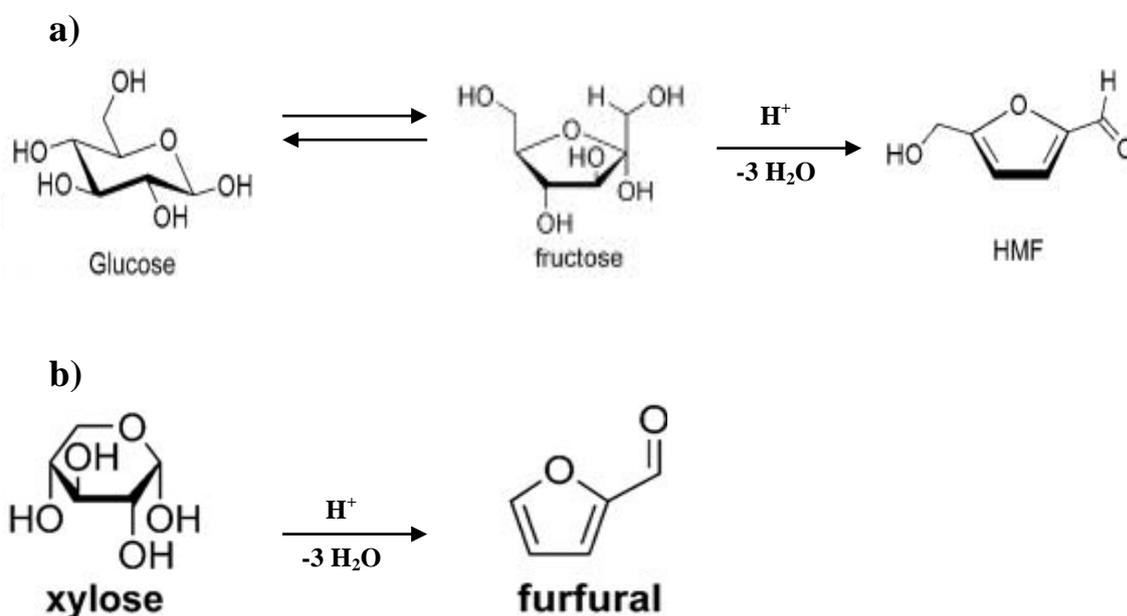


Figure 49: Schéma de formation du HMF (a) et du furfural (b) à partir du glucose et du xylose respectivement (Binder *et al.*, 2010, Mäki-Arvela *et al.*, 2012).

Les hydrolysats ont été analysés par HPLC afin d'identifier la formation d'HMF et de 2-F. Les concentrations obtenues en HMF et en 2-F dans les hydrolysats sont indiquées dans le tableau 22 suivant le plan expérimental et en fonction du facteur de sévérité.

D'après ce tableau, les concentrations en HMF et 2-F varient en fonction des conditions d'hydrolyse. La concentration en 2-F est beaucoup plus élevée que celle du HMF. Elle varie de 0,05 à 31,04 mg/g contre 0,01 à 1,20 mg/g respectivement. Les résultats expérimentaux présentés dans le tableau 22 indiquent que la concentration maximale en HMF et en 2-F est obtenue dans les conditions sévères du traitement (LogR'0 = 0,36).

Tableau 22 : Effet du traitement sur la concentration des produits de dégradation des sucres.

Expériences	Température (°C)	Temps (min)	pH	Facteur de sévérité combiné (LogR'0)	HMF (mg/g)	2-F (mg/g)
E1	160	10	5	-2,23	0,02	2,32
E2	140	5	5	-3,12	0,01	0,05
E3	180	5	5	-1,95	0,14	5,30
E4	140	15	5	-2,65	0,02	0,30
E5	180	15	5	-1,47	0,67	8,62
E6	140	10	3	-0,82	0,06	0,60
E7	180	10	3	0,36	1,20	31,04
E8	160	10	5	-2,23	0,06	1,70
E9	140	10	7	-4,82	0,08	0,28
E10	180	10	7	-3,65	0,44	3,80
E11	160	5	3	-0,53	0,07	3,17
E12	160	15	3	-0,06	0,73	4,50
E13	160	5	7	-4,53	0,02	0,68
E14	160	15	7	-4,06	0,08	2,62
E15	160	10	5	-2,23	0,04	2,10

La différence entre la concentration en HMF et 2-F peut s'expliquer par le fait que le HMF se forme à partir de la décomposition thermique du glucose et du fructose, plus particulièrement du fructose (Kühnel *et al.*, 2011). Or, lors du dosage des sucres neutres dans la pectine de betterave, nous avons juste décelé une petite teneur en glucose de l'ordre de 0,53%. La formation du 2-F est quant à elle liée à la dégradation des pentoses et des acides uroniques (Kühnel *et al.*, 2011). Les travaux de Martinez *et al.*, 2009 et ceux de Sato *et al.*, 2013 ont rapporté que lors du traitement thermique des pulpes de betterave, le monosaccharide qui se

solubilise en abondance est l'arabinose, vient ensuite le galactose. Les autres monosaccharides (fructose, glucose, xylose et mannose) sont sous forme de traces. Par ailleurs, l'acide galacturonique, le constituant majeur de la pectine est également solubilisé. Cela explique les fortes teneurs observées dans le cas du 2-F puisque nous avons montré précédemment (Figure 45), qu'à pH acide et à température élevée, la production d'acide galacturonique est maximale.

Les données de ces expériences suggèrent que les traitements réalisés à une température de 180°C, pH 3 et pendant une durée de 10 min ($\text{LogR}'0 \geq 0,36$) conduisent à renforcer la dégradation de l'arabinose et de l'acide galacturonique et par conséquent à favoriser les produits de décomposition.

III.2.5 Conclusion

Le traitement de la pectine de betterave par micro-ondes a été investigué dans le but de produire des POS. Cela a été réalisé suivant un plan expérimental de type Box-Behnken à trois variables, à savoir : la température, le pH et la durée du traitement. Les paramètres optimaux pour maximiser les rendements en POS ont été déterminés d'après des surfaces de réponse. Les résultats obtenus montrent que le pH est le principal facteur qui influe sur les rendements.

Un rendement maximal en POS de l'ordre de 800 mg/g de pectine est obtenu avec les conditions d'hydrolyse suivantes: température 140°C, pH 3 et la durée du traitement de 15 min. De plus, sous cette condition optimale le minimum d'acide galacturonique libre et de produits de dégradation est obtenu. Ainsi, en faisant varier les conditions d'hydrolyse, nous avons montré qu'il était possible de produire des POS par traitement hydrothermique.

Le réacteur micro-ondes peut être un outil efficace pour l'hydrolyse partielle de la pectine de betterave en POS. Cette technique est rapide et efficace. De plus, elle peut être potentiellement intéressante au niveau coûts.

La mise en place au niveau industriel des micro-ondes n'est pas encore très répandue. Cependant, l'étude réalisée ici peut être considérée comme du screening de conditions qui pourront être transférées à une plus grande échelle en réacteur thermique.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

La croissance rapide du marché des aliments fonctionnels et la valeur ajoutée des oligosaccharides non digestibles favorisent la recherche de matières premières alternatives et les technologies de production adaptées à la fabrication de nouveaux prébiotiques commercialisables. La pectine de betterave peut constituer une matière première alternative importante, mais elle n'a jusqu'à présent été utilisée que dans un nombre limité d'applications.

Des études indiquent un avenir prometteur pour les oligosaccharides pectiques (POS), qui sont classés comme des prébiotiques émergents et dont les propriétés ont été confirmées par des fermentations *in vitro* avec des inoculums fécaux (Mandalari *et al.*, 2007).

Ces POS peuvent être obtenus par traitements chimique, enzymatique ou même physique (hydrothermique, irradiation γ et ultrasons) (Gallifuoco *et al.*, 2004 ; Miyazawa *et al.*, 2008 ; Martinez *et al.*, 2009 ; Burana-Osot *et al.*, 2010 ; Kühnel *et al.*, 2011).

Nos travaux s'inscrivent dans ce cadre général et plus particulièrement celui concernant la production de POS par traitements enzymatique et thermique de la pectine de betterave en vue d'une utilisation à des fins alimentaires.

Tout d'abord, l'étude a consisté en l'évaluation de l'efficacité de six pectinases commerciales à produire des POS à partir d'un substrat simple, l'acide polygalacturonique. L'évaluation a été faite sur la base de 3 critères : (i) la présence d'activité endopolygalacturonase, (ii) la pureté des préparations commerciales, (iii) la capacité à faire des POS dans le temps. De cette étude, une seule préparation (Endopolygalacturonase M2) a été retenue pour la suite du travail. Cette préparation commerciale exempte de contaminations par d'autres activités, a conduit à la plus forte concentration en oligogalacturonides avec des rendements de 58% pour DP3, 18% pour DP2 et 13% pour DP1 après 2 heures de réaction.

La mise en œuvre de l'hydrolyse d'un substrat plus complexe (la pectine de betterave) avec l'Endopolygalacturonase M2 afin de produire des POS dans la seconde partie de notre étude, a montré des limites. Cette incapacité à dépolymériser la pectine de betterave semble logique dans la mesure où l'activité endopolygalacturonase est inhibée par les fonctions esters de la pectine. En prenant le parti de combiner l'endopolygalacturonase M2 et une pectineméthylestérase commerciale (Rapidase Smart®), nous avons montré qu'il était possible de surmonter les difficultés rencontrées. Ainsi une cinétique d'hydrolyse a conduit à

l'obtention de trois POS en 2, 5 et 15 minutes d'hydrolyse identifiés : PB 2 min, PB 5 min et PB 15 min.

La composition et les propriétés thermiques des POS produits ont été évaluées. La caractérisation sur le critère taille et composition a été réalisée par HPSEC et HPAEC-PAD. Nous avons noté la présence de 4 familles moléculaires de proportions différentes pouvant être regroupées en deux fractions : polymères de haute masse et oligomères. Des oligosaccharides de DP compris entre 2 et 9 ont été identifiés.

L'influence de différence de composition sur les propriétés physiques a été investiguée par l'utilisation d'outils tels que l'analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, l'analyse calorimétrique différentielle, la diffraction des rayons X et l'analyse par microscopie optique. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les témoins (pectine de betterave et pectine de betterave déestérifiée).

L'analyse thermique a révélé que les modifications enzymatiques ont entraîné une diminution de la stabilité thermique des POS comparée à celle de la pectine de départ. Par ailleurs, l'analyse des spectres obtenus par l'infrarouge n'a montré aucun changement majeur dans les groupes fonctionnels avant et après hydrolyse. Les résultats du rayon X révèlent le caractère amorphe des POS contrairement aux pectines de betterave. Cela est aussi confirmé par l'analyse des échantillons au microscope optique sous lumière polarisée.

Une seconde voie de production de POS a été explorée dans cette étude. Il s'agit d'un traitement hydrothermique par le biais de micro-ondes. Afin de définir les conditions d'hydrolyse permettant de produire des POS en limitant la libération d'acide galacturonique, un plan d'expérience de type Box-Behnken à trois facteurs (température, pH et durée) a été appliqué. Ainsi, 15 essais d'hydrolyses ont été mis en œuvre pour décrire la production d'acide galacturonique et de POS sous l'effet combiné des 3 facteurs. Dans un premier temps, l'analyse des hydrolysats par HPSEC et HPAEC-PAD a révélé l'effet important des conditions d'hydrolyse sur la composition et le rendement des produits.

L'analyse statistique a montré un effet significatif de tous les paramètres testés sur la production d'acide galacturonique et de POS. Le pH apparaît le plus important, suivi de la

température et de la durée du traitement. Les modèles obtenus pour l'acide galacturonique et les POS permettent d'expliquer respectivement 91,7% et 92,4% des variations observées.

Des courbes de contour ont été construites pour une analyse plus aisée de l'effet des différents facteurs sur les réponses étudiées. De ces courbes, nous retenons que les conditions optimales sont les suivantes : la température se situe à 140°C, le pH est fixé à 3 et la durée du traitement est fixée à 15 min. Ces optimums donnent un bon rendement en POS de l'ordre de 800 mg/g de pectine avec 25 mg/g d'acide galacturonique libre. La formation de produits de dégradation que sont HMF et 2-F s'est avérée faible pour ces optimums. Ce screening a permis de déterminer des paramètres optimaux qui pourront être appliqués à une échelle plus grande en réacteur thermique par exemple.

L'un des apports principaux de cette étude réside dans l'ensemble des outils utilisés pour aborder non seulement la production mais aussi la caractérisation physico-chimique des oligosaccharides pectiques.

Il est important de rappeler que notre étude s'inscrit dans un objectif plus large de production d'oligosaccharides d'intérêt prébiotique. Même si cette étude pluridisciplinaire montre d'un point de vue pratique que l'obtention de POS est possible grâce aux voies explorées, les observations faites sur les hydrolysats font état d'un mélange complexe de molécules. Une meilleure caractérisation puis une maîtrise de la production s'impose.

Il serait aussi intéressant de mettre au point une stratégie de synthèse d'oligosaccharides de DP différents et ainsi établir une corrélation entre les facteurs de réponses et la concentration des différents DP pour faciliter l'identification et la quantification.

Une analyse plus approfondie de la composition moléculaire du mélange d'oligosaccharides pourrait être envisagée. Un fractionnement à l'échelle préparative des principaux constituants permettrait une poursuite plus aisée de la caractérisation avec d'autres outils.

L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et de la désorption-ionisation laser assistée par matrice à temps de vol (MALDI-TOF) apportera des compléments d'information sur la nature des constituants. La résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-

MS) peuvent être envisagées pour élucider les structures et les types de liaisons au sein du polymère.

On peut encore citer la chromatographie liquide d'interaction hydrophile couplée au détecteur évaporatif à diffraction de lumière et à la spectrométrie de masse (HILIC-ELSD-MSⁿ) qui s'est avérée être un outil performant dans la détermination de la structure des oligosaccharides dans des mélanges complexes (Leijdekkers *et al.*, 2011). Des résultats prometteurs ont été obtenus récemment dans la séparation et la caractérisation d'une large gamme d'oligosaccharides neutres et acides dérivés de polysaccharides pariétaux. Cette piste peut être explorée.

Nous avons montré par cette étude que l'utilisation du réacteur micro-ondes pour la production d'oligosaccharides pectiques est faisable et présente l'avantage d'être une méthode efficace et fiable. Il serait aussi intéressant de faire varier les paramètres de l'appareillage afin d'évaluer la contribution de chaque paramètre dans la production de POS.

Ensuite pour une valorisation des produits, il sera nécessaire d'établir une relation structure-propriétés des mélanges d'oligosaccharides obtenus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Technology*, **43**, 808-814.
- Ahlawat S., Dhiman S.S., Battan B., Mandhan R.P., Sharma J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, **44**(5), 521–526.
- Alkorta I., Garbisu C., Liama M.J., Serra J.L. (1997). Industrial applications of pectic enzymes : a review. *Process Biochemistry*, **33**(1), 21-28.
- Amen-Chen C., Pakdel H., Roy C. (2001). Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. *Bioresource Technology*, **79**, 277–299.
- Arunachalam C., Asha S. (2010). Pectinolytic Enzyme- A Review of New Studies, Research Department of Microbiology, Enathur, Kanchipuram (India) *Advanced biotech journal-online*, 631-561.
- Axelos M.A.V., Thibault J-F. (1991). Influence of the substituents of the carboxyl and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, **13**, 77-82.
- Baldan B., Bertoldo A., Navazio L., Mariani P. (2003). Oligogalacturonide-induced changes in the developmental pattern of *Daucus carota L.* somatic embryos. *Plant Science*, **165**, 337-348.
- Barbero G.F., Palma M., Barroso C.G. (2006). Determination of capsinoids in peppers by microwave assisted extraction high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, **578**, 227-233.
- Baron A., Saulier B., Prioult C., Drilleau J.F. (1988). Automatisation de la mesure de l'activité des polyosidases. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **21**, 92-95.
- Barreteau H., Delattre C., Michaud P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology Biotechnology*, **44**(3), 323-333.
- Bélafi-Bako K., Eszterle M., Kiss K., Nemestóthy N., Gubicza L. (2007). Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering*, **78**, 438-442.
- Benen J.A.E., Kester H.C.M., Visser J. (1999). Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal Biochemistry*, **259**, 577-585.
- Benko Z., Andersson A., Szengyel Z., Gaspar M., Reczey K., Stalbrand H. (2007). Heat extraction of maize fiber hemicellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **137**, 253-265.

- Bhushan S., Kalia K., Sharma M., Singh B., Ahuja P.S. (2008). Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, **28**, 285-296.
- Binder K., Baschnagel J., Paul W.(2003). Glass transition polymer melts: test of theoretical concepts by computer simulation. *Progress Polymer Science*, **28**, 115-172.
- Binder J.B., Blank J.J., Cefali A.V., Raines R.T. (2010). Synthesis of Furfural from Xylose and Xylan. *Chemistry and Sustainability Energy and Materials*, **3**, 1268-1272.
- Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A. (1983). A simple and rapid preparation of alditols acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*. **113**, 291-299.
- Blanco P., Sieiro C., Villa G.T. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **175**, 1-9.
- Bonnin E., Dolo E., Le Goff A., Thibault J.-F. (2002a). Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydrate Research*, **337**, 1687-1696.
- Bonnin E., Saulnier L., Brunel M., Marot C., Lesage-Meesen L., Asther M., Thibault J.-F. (2002b). Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 1000-1005.
- Bonnin E., Clavurier K., Daniel S., Kauppinen S., Mikkelsen J.D.M., Thibault J.-F. (2008). Pectin acetylsterases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonane as well as rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers*, **74**, 411-418.
- Bradford M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Burana-Osot J., Soonthornchareonnon N., Chaidedgumjorn A., Hosoyama S., Toida T. (2010). Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection. *Carbohydrate Polymers*, **81**, 461-465.
- Cameron R.G., Luzio G.A., Goodner K., Williams M.A.K. (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers*, **71**, 287-299.
- Cameron R.G., Luzio G.A., Vasu P., Savary B.J., Williams M.A.K. (2011). Enzymatic modification of a model homogalacturonan with the thermally Tolerant pectin methylesterase from citrus: 1. Nanostructural characterization, enzyme mode of action and effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 2717-2724.
- Capel F., Nicolai T., Durand D., Boulenger P., Langendorff V. (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, **20**, 901-907.

Chauhan D., Li G., Podar K., Hideshima T., Neri P., He D., Mitsiades N., Richardson P., Chang Y., Schindler J., Carver B., Anderson K.C. (2005). A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Research*, **65**(18), 8350-8358.

Chaudhri A., Suneetha V. (2012). Microbially derived pectinases: A review. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **2**(2), 2278-3008.

Chen L., Song D., Tian Y., Ding L., Yu A., Zhang H. (2008). Application of on-line microwave sample. Preparation techniques. *Trends Analytical Chemistry*, **27**, 151-159.

Chiacchierini E., Mele G., Restuccia D., Vinci G. (2007). Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends in Food Science and Technology*, **18**(6), 299-305.

Christgau S., Kofod L.V., Halkier T., Andersen L.N., Hockauf M., Doerreich K., Dalboge H., Kauppinen S. (1996). Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical Journal*, **319**, 705-712.

Contrevas Esquivel J.C., Voget C.E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal Biotechnology*, **110**, 21-28.

Courtois J. (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion Microbiology*, **12**, 261-273.

Das S., Mukhopadhyay A.K., Datta S., Basu D. (2009). Prospects of microwave processing: an overview. *Bulletin of Materials Science*, **32**(1), 1-13.

Delattre C., Vijayalakshmi M.A. (2009). Monolith enzymatic microreactor at the frontier of glycomics toward a new route for the production of bioactive oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **60**, 97-105.

Denès J.M., Baron A., Renard C.M.G.C., Péan C., Drilleau J.F. (2000). Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research*, **327**, 385-393.

De Paula V.C., Pinheiro I.O., Lopes C.E., Calazans G.M.T. (2008). Microwave-assisted hydrolysis of *zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. *Bioresource Technology*, **99**, 2466-2470.

De Vries R.P., Parenicova L., Hinz S.W.A., Kester H.C.M., Beldman G., Benen J.A.E., Visser J. (2002). The β -1,4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 4985-4993.

De Vries R.P., Visser J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, 497-522.

- Doco T., Williams P., Vidal S., Pellerin P. (1997). Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate research*, **297**, 181-186.
- Dongowski G., Lorenz A., Proll J. (2002). The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. *The Journal of Nutrition*, **132**, 1935-1944.
- Dumville Jo.C., Fry S.C. (2000). Uronic acid-containing oligosaccharins: Their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**(1/2), 125-140.
- Einhorn-Stoll U., Kunzek H. (2009). Thermoanalytical characterization of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, **23**, 40-52.
- Einhorn-Stoll U., Kunzek H., Dongowski G. (2007). Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids*, **21**, 1101-1112.
- Elboutachfai R., Delattre C., Courtois B., Courtois J. (2008). Oligogalacturonans production by free radical depolymerization of polygalacturonan. *International Journal of Biological macromolecules*, **43**, 257-261.
- Fanaro S., Jelinek J., Stahl B., Boehm G., Kock R., Vigi V. (2005). Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: Effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **41**, 186-190.
- Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G.O., Nishinari K., Funami T., Williams P.A. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, **72**, 334-341.
- Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T., Vniegra-Gonzalez G. (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology Biotechnology*, **44**(2), 221-227.
- Foda MS., Rizk I.R.S., Gibriel A.Y., Basha S.I. (1984). Biochemical properties of polygalacturonase, produced by *Aspergillus aculeatus* and *Mucor pusillus*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, **139**, 463-469.
- Gadre R.V., Van Driessche G., Van Beeumen J., Bhat M.K. (2003). Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 321-330.
- Gallifuoco A., Cantarella M., Viparelli P., Marucci M. (2004). Polygalacturonic acid/endo-polygalacturonase system: A kinetic study in batch reactors. *Biotechnology Progress*, **20**, 1430-1436.
- Garna H., Mabon N., Nott K., Wathelet B., Paquot M. (2004). New method for two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4652-4659.

- Gainvors A., Nedjaoum N., Gognies S., Muzart M., Nedjma M., Belarbi A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, **183**, 131-135.
- Georget D.M.R., Smith A.C., Waldron K.W. (1999). Thermal transitions in freeze-dried carrot and its cell wall components. *Thermochimica Acta*, **332**, 203-210.
- Gibson G. R., Probert H. M., Van Loo J., Rastall R. A., Roberfroid M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, **17**, 259-275.
- Gielkens M., Gonzalez-candelas L., Sanchez-Torres P., Van de Vondervoort P., De graaff L., Viser J., Ramon D. (1999). The abfB gene encoding the major α -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans* : nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain. *Microbiology*, **145**, 735-741.
- Goupy Jacques. (2006). Les plans d'expériences, *Revue Modulad*, Numéro 34, pp. 74-116.
- Guillon F., Thibault J.-F. (1988). Further characterization of acid and alkali soluble pectins from sugar beet pulp. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **21**, 198-205.
- Guillotin S.E., Van Loey A., Boulenguer P., Schols H.A., Voragen A.G.J. (2007). Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids*, **21**, 85-91.
- Gullón B., Gómez B., Martínez-Sabajanes M., Yáñez R., Parajó J.C., Alonso J.L. (2013). Pectic oligosaccharides: manufacture and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, **30**, 153-161.
- Hajaligol M.R., Waymack B., Kellogg D. (1999). Formation of aromatic hydrocarbons from pyrolysis of carbohydrates. *American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry*, **44**, 251–255.
- Hilden L.R., Morris K.R. (2004). Physics of amorphous solids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **93**, 3-12.
- Hilz H., Williams P., Doco T., Schols H.A., Voragen A.G.J. (2006). The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is present as a dimer in pectic populations of bilberries and black currants in muro and in juice. *Carbohydrate Polymers*, **65**, 521-528.
- Hinz S.W.A., Verhoef R., Schols H.A., Vincken J.-P., Voragen A.G.J. (2005). Type I arabinogalactan contains b-D-Galp-(1-3)-b-D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research*, **340**, 2135–2143.
- Hotchkiss A.T., Olano-Martin E., Grace W.E., Gibson G.R., Rastall R.A. (2003). Pectic oligosaccharides as prebiotics. *ACS Symposium Series*, **849**, 54-62.
- Hu T., Li C., Zhao X., Li G., Yu G., Guan H. (2013). Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method. *Carbohydrate Research*, **373**, 53-58.

Ishii T., Matsunaga T., Pellerin P., O'Neill M.A., Darvill A., Albersheim P. (1999). The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**(19), 13098-13104.

Ishii T., Matsunaga T. (1996). Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, **284**, 1-9.

Iwasaki K., Inoue K., Matsubara Y. (1998). Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo-polygalacturonase in a continuous stirred tank reactor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **62**, 262-272.

Jackson C.L., Dreaden T.M., Theobald L.K., Tran N.M., Beal T.L., Eid M., Gao M.Y., Shirley R.B., Stoffel M.T., Kumar M.V., Mohnen D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, **17**(8), 805-819.

Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, **40**, 2931-2944.

Kappe C.O. (2004). Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **43**, 6250-6284.

Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, **77**, 215-227.

Khanh NQ., Rutkowski E., Leidinger K., Albrecht H., Gottschalk M. (1991). Characterisation and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*. *Gene*, **106**, 71-77.

Kobayashi M., Matoh T., Azuma J.I. (1996). Two chains of rhamnogalacturonan-II are cross-link by borate-diol ester bonds in higher plant cells. *Plant Physiology*, **110**, 1017-1020.

Kühnel S., Schols H.A., Gruppen H. (2011). Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: Examination of the effects of mild acid and hydrothermal pre-treatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnology for Biofuels*, **4**, 1-14.

Laurent M.A., Boulenger P. (2003). Stabilization mechanism of acid dairy drinks (AMD) induced by pectin. *Food Hydrocolloids*, **17**, 445-454.

Leijdekkers A.G.M., Sanders M.G., Schols H.A., Gruppen H. (2011). Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 9227-9235.

Leroux H., Schubert E. (1983). Les applications des pectines HM dans les industries agro-alimentaires. *Industries Alimentaires et Agricoles*. 615-618.

Levigne S., Thomas M., Ralet M.-C., Quemener B., Thibault J.-F. (2002). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectin using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*, **16**, 547-550.

Letellier M., Budzinski H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds *Analisis*, **1999**, 27, 259-271.

Li T., Li S., Du L., Wang N., Guo M., Zhang J. (2010). Effects of haw Pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet. *Food Chemistry*, **121**(4), 1010-1013.

Li X.-M., Le G.-W., Cheng J.-X., Wang F., Shi Y.-H. (2006). Optimization of microwave-assisted solid phase oligosaccharides synthesis reaction and analysis of components and structure of synthetic product. *Carbohydrate Polymers*, **64**, 408-418.

Liu Q., Wang S., Zheng Y., Luo Z., Cen K. (2008). Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis, *Journal of Analytical and Applied pyrolysis*, **82**, 170-177.

Mäki-Arvela P., Salminen E., Riittonen T., Virtanen P., Kumar N., Mikkola J-P. (2012). The challenge of efficient synthesis of biofuels from lignocellulose for future renewable transportation fuels. *International Journal of Chemical Engineering*, **2012**, 1-10.

Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. (2007). Microwave assisted extraction- an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, **1**, 7-18.

Mandalari G., Palop C.N., Tuohy K., Gibson G.R., Bennett R.N., Waldron K.W., Bisignano G., Narbad A., Faulds C.B. (2007). In vitro evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 1173-1179.

Manderson K., Pinart M., Tuohy K.M., Grace W.E., Hotchkiss A.T., Widmer W., Yadhav M.P., Gibson G.R., Rastall R.A. (2005). In vitro determination of the prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacture by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(12), 8383-8389.

Mangiacapra P., Gorrasi G., Sorrentino A., Vittoria V. (2006). Biodegradable nanocomposites obtained by ball milling of pectin and montmorillonites. *Carbohydrate Polymers*, **64**, 516-523.

Marchal L.M., Beeftink B.B., Tramper J. (1999). Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends Food Science Technology*, **10**, 345-355.

Marfà V., Gollin D.J., Eberhard S., Mohnen D., Darvill A., Albersheim P. (1991). Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *Plant Journal*, **1**(2), 217-225.

Martínez M., Gullón B., Yáñez R., Alonso J.L., Parajó J.C. (2010). Kinetic assesment on the autohydrolysis of pectin-rich by-products. *Chemical Engineering Journal*, **162**(2), 480-486.

Martínez M., Gullón B., Schols H.A., Alonso J.L., Parajó J.C. (2009). Assesment of the production of oligomeric compounds from sugar beet pulp. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **48**(10), 4681-4687.

- Martins E.S., Silva D., Da Silva R., Gomes E. (2002). Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, **37**, 949-954.
- Matsumoto T., Moriya M., Sakurai M.H., Kiyohara H., Tabuchi Y., Yamada H. (2008). Stimulatory effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L., on G-CSF secretion from intestinal epithelial cells. *International Immunopharmacology*, **8**(4), 581-588.
- Mesbahi G., Jamalian J., Farahnaky A. (2005). A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids*, **19**, 731-738.
- Messiaen J., Van Cutsem P. (1994). Pectic signal transduction in carrot cells: membrane, cytosolic nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiology*, **35**, 677-689.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**(3), 426-428.
- Miyazawa T., Ohtsu S., Funazukuri T. (2008). Hydrothermal degradation of polysaccharides in a semi-batch reactor: product distribution as a function of severity parameter. *Journal of Materials Science*, **43**, 2447-2451.
- Mohnen D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 266-277.
- Mussatto S.I., Mancilha I.M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 587-597.
- Mutter M., Beldman G., Pitson S.M., Schols H.A., Voragen A.G.J. (1998). Rhamnogalacturonan α -D-galactopyranosyluronohydrolase: An enzyme that specifically removes the terminal non reducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiology*, **117**, 153-163.
- Najafian L., Ghodsvali A., Haddad Khodaparast M.H., Diosady L.L. (2009). Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food research international*, **42**, 171-175.
- Øbro J., Harholt J., Scheller H.V., Orfila C. (2004). Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry*, **65**, 1429-1438.
- Olano-Martin E., Williams M.R., Gibson G.R., Rastall R.A. (2003). Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiology Letters*, **218**, 101-105.
- Olano-Martin E., Gibson G.R., Rastall R.A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, **93**, 505-511.

- Panchev I.N., Slavov A., Nikolova K., Kovacheva D. (2010). On the water-sorption properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, **24**,763-769.
- Pedersen M., Meyer A.S. (2010). Lignocellulose pretreatment severity-relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, **27**, 739-750.
- Pereira R.N., Vicente A.A. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, **43**, 1936-1943.
- Perez S., Mazeau K., Hervé Du Penhat C. (2000). The three-dimensional structures of pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**, 37-55.
- Perrone P., Hewage C.M., Thomson A.R., Bailey K., Salder I.H., Fry S.C. (2002). Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry*, **60**, 67-77.
- Pinelo Manuel., Jonsson Gunnar., Meyer A.S. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, **70**, 1–11.
- Prasanna V., Prabha T.N., Tharanathan R.N. (2006). Multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L. cv Alphonso) fruit. *Food Chemistry*, **90**, 30-36.
- Qiang X., Yonglie C., Qianbing W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **77**, 435-441.
- Ralet M-C., Cabrera J.C., Bonnin E., Quémener B., Hellín P., Thibault J-F. (2005). Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, **66**(15), 1832-1843.
- Raghuwanshi S., Gupta A., Srivastava A., Singh D., Nema R., Jawre A.K., Pratap B., Verma S., Shrivastva H., Dadse D., Binjhade D., Ghidode S., Thakre S. (2013). Pectolytic enzyme and its global applications: a review. *Journal of Science and Technology*, **1**, 1-9.
- Rastall R.A., Maitin V. (2002). prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 490-496.
- Renard CMGC., Thibault J-F. (1996). Degradation of pectins in alkaline conditions: Kinetics of demethylation. *Carbohydrate Research*, **286**, 139-150.
- Renard CMGC. (1989). Etude des polysaccharides pariétaux de la pomme. Extraction et caractérisation par des méthodes chimiques et enzymatiques. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, **57**, 929-967.
- Rombouts F.M., Thibault J-F. (1986). Sugar beet pectins: chemical structure and gelation through oxidative coupling. In Fishman M.L., Jen J.J. Chemistry and function of pectins. Washington DC, USA: *American Chemical Society*, 49-60.

- Ros J.M., Schols H.A., Voragen.A.G.J. (1996). Extraction, characterisation, and enzymatic degradation of lemon peel pectins. *Carbohydrate research*, **282**, 271-284.
- Rose D.J., Inglett G.E. (2010). Production of feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. *Food chemistry*, **119**, 1613-1618.
- Roy I., Gupta M.N. (2003). Application of microwaves in biological sciences. *Current Science*, **85**, 1685-1693.
- Sakamoto T., Bonnin E., Quemener B., Thibault J.-F. (2002). Purification and characterization of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1572**, 10-18.
- Sakai T., sakamoto T., Hallaert J., vandamme E.J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, **39**, 213-279.
- Sato N., Takano Y., Mizuno M., Nozaki K., Umemura S., Matsuzawa T., Amano Y., Makishima S. (2013). Production of feruloylated arabino-oligosaccharides (FA-AOs) from beet fiber by hydrothermal treatment. *The Journal of Supercritical Fluids* (2010), doi:10.1016/j.supflu.2013.01.012.
- Schmelter T., Wientjes R., Vreeker R., Klaffke W. (2002). Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, **47**, 99-108.
- Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D., Voragen A.G.J. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate research*, **279**, 265-279.
- Sharma S.K., Liptay A., Le Maguer M. (1998). Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. *Food Research International*, **30**(7), 543-547.
- Shen D.K., Gu S. (2009). The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. *Bioresource Technology*, **100**, 6496–6504.
- Sila D.N., Van Buggenhout S., Duvetter T., Fraeye I., De Roeck A., Van Loey A. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part II: structure, function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **82**, 86-104.
- Singh V., Tiwari A. (2009). Hydrolytic fragmentation of seed gum under microwave irradiation. *International Journal of biological macromolecules*, **44**, 186-189.
- Somogyi M. (1960). Modifications of two methods for the assay of amylase. *Clinical Chemistry*, **6**, 23-35.
- Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J., Mahugo-Santana C. (2005). An environmentally friendly method for the extraction and determination of priority phenols in soils using microwave-assisted micellar extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 125-133.

- Souza B.S., Moreira A.P.D., Teixeira A.M.R.F. (2009). TG–FTIR coupling to monitor the pyrolysis products from agricultural residues. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **97**, 637–642.
- Souto-Maior J.F.A., Reis A.V., Pedreiro L.N., Cavalcanti O.A. (2010). Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polymer International*, **59**, 127-135.
- Sowbhagya H.B., Srinivas P., Purnima K T., Krishnamurthy N. (2011). Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Food Chemistry*, **127**, 1856–1861.
- Strasser G.R., Amadò R. (2002). Pectic substances from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*). Part II. Structural characterisation of rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, **48**, 263-269.
- Suzuki T., Tomita-Yokotani K., Yoshida S., Takase Y., Kusakabe I., Hasegawa K. (2002). Preparation and isolation of oligogalacturonic acids and their effects in cockscomb (*Celosia argentea* L) seedlings. *Journal of Plant Growth regulation*, **21**, 209-215.
- Swennen K., Courtin C.M., Delcour, J.A. (2006). Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Food Science and Nutrition*, **46**, 459-471.
- Tavčer P.T. (2011). Biotechnology in Textiles- an Opportunity of Saving Water. In Waste Water- Treatment and Reutilization; Einschlag F.S.G., Ed. ISBN: 978-953-307-249-4, InTech, DOI: 10.5772/16176. Available from: <http://www.intechopen.com/books/waste-water-treatment-and-reutilization/biotechnology-in-textiles-an-opportunity-of-saving-water>.
- Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K. (1997). Chemistry and uses of pectin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **37**(1), 47-73.
- Thibault J.-F., Renard C.M.G.C., Axelos M.A.V., Roger P., Crepeau M.J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate research*, **238**, 271-286.
- Tho I., Kjonilsen A-L., Knudsen K.D., Nyström B. (2006). Effect of solvent composition on the association behaviour of pectin in methanol-water mixtures. *European Polymer Journal*, **42**, 1164-1172.
- Torto N., Gorton L., Marko-Varga G., Emnéus J., Åkerberg C., Zacchi G., Laurell T. (1997). Monitoring of enzymatic hydrolysis of starch by microdialysis sampling coupled on-line to anion exchange chromatography and integrated pulsed electrochemical detection using post-column switching. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**(5), 546-554.
- Tsubaki S., Nakauchi M., Ozaki Y., Azuma J. (2009). Microwave heating for solubilization of polysaccharide and polyphenol from soybean residue (Okara). *Food Science and technology Research*, **15**, 307-314.
- Van Cutsem P., Pino Cabrera J.C. (2008). Composition comprising oligogalacturonans and polycationic saccharides. WO 2008/065151 A1.

- Van der Poel P.W., Schiweck H., Schwartz T.(1998). Sugar Technology: Beet and Cane Sugar Manufacture. *Batens, Berlin*.
- Vazquez C., Patiño B., Martinez M.J. (1993). Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, **110**, 191-196.
- Verlent I., Smout C., Duvetter T., Hendrickx M.E., Van Loey A. (2005). Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6**, 293-303.
- Vincken J.-P., Schols H.A., Oomen R.J.F.J., McCann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F. (2003). If homogalacturonane were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, **132**, 1781-1789.
- Voragen A.G.J., Schols H.A., Pilnik W. (1986). Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by HPLC. *Food Hydrocolloids*, **1**, 65-70.
- Voragen A.G.J., Pilnik W., Thibault J.-F., Alexos M.A.V., Renard C.M.G.C. (1995). Food polysaccharides and their applications. In A.M. Stephen, Editor, *Food Science and Technology Series*, Marcel Dekker, New-york. Chap **10**, pp 287-339.
- Wang J., Zhang J., Zhao B., Wang X., Wu Y., Yao J. (2010). A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers*, **80**, 84-93.
- Wang Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, **42**, 8-12.
- Willats W.G.T., Knox J.P., Mikkelsen J.D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, **17**, 97-104.
- Xing R., Yu H., Guo Z., Wang P., Li C., Li Z., Li P. (2005). Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydrate research*, **340**, 2150-2153.
- Yadav S., Yadav P.K., Yadav D., Yadav K.D.S. (2009). Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, **44**, 1-10.
- Yuan P., Meng K., Luo H., Shi P., Huang H., Bai Y., Yang P., Yao B. (2011). A novel low-temperature active alkaline pectate lyase from *Klebsiella* sp. Y1 with potential in textile industry. *Process Biochemistry*, **46**, 1921-1926.
- Zhang S.B., Wang Z., Xu S.Y. (2007). Optimization of the Aqueous Enzymatic Extraction of Rapeseed Oil and Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **84**, 97-105.
- Zhongdong L., Guohua W., Yunchang G., Kennedy J.F. (2006). Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, **64**, 548-552.

Zhou S., Xu Y., Wang C., Tian Z. (2011). Pyrolysis behavior of pectin under the conditions that simulate cigarette smoking. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **91**, 232-240.