

# **PRODUCTION ENZYMATIQUE D'OLIGOSACCHARIDES A PARTIR DE GOMME DE CAROUBE**

**MATHILDE SIMON**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010**

**CO-PROMOTEURS : PROFESSEUR M. PAQUOT  
INGENIEUR S. GILLET**

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Paquot, promoteur de ce travail de fin d'études, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Chimie Biologique industrielle.

Je tiens également à remercier chaleureusement l'Ingénieur Sébastien Gillet pour l'encadrement de ce mémoire, ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements.

Je remercie le Professeur Christophe Blecker de l'Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires de m'avoir permis de réaliser des mesures au sein de l'unité et du temps accordé pour répondre à mes questions.

Mes prochains remerciements seront pour le Professeur Bernard Wathelet, le Professeur Catherine Charles et le Docteur Jacqueline Destain pour les précieux conseils prodigués tout au long de ce travail.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Dorothée Goffin et l'Ingénieur Stéphanie Heuskin pour l'aide apportée dans le cadre de la validation de méthode.

Un grand merci à Isabelle, Virginie, Catherine et Laurence ainsi qu'à tout le personnel de l'unité de Chimie Biologique et Industrielle pour leur aide, leurs conseils, leurs encouragements et tous les bons moments passés.

Mes derniers remerciements seront pour mes proches, ma sœur Camille, mes parents, Quentin et pour tous ceux qui ont partagé ces cinq années à mes côtés.

## RESUME

Le cadre général de cette étude est la découverte de prébiotiques et plus spécifiquement la production d'oligosaccharides par hydrolyse enzymatique de la gomme de caroube. Ceux-ci, encore peu étudiés, pourraient présenter un riche potentiel en prébiotiques.

Ce travail avait pour objectifs la purification de  $\beta$ -mannanases situées dans des graines de caroube en germination, ainsi que la validation d'une méthode AEC-PAD applicable à l'analyse des hydrolysats de gomme de caroube.

Dès lors, il a permis d'établir un protocole de concentration et de purification des  $\beta$ -mannanases et de déterminer une technique de conservation adéquate des extraits enzymatiques.

Une méthode originale d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la viscosité a également été mise au point et permet notamment l'étude de l'évolution des activités enzymatiques au cours de la germination.

La validation d'une méthode de caractérisation et de quantification des (galacto)-manno-oligosaccharides constitue le dernier volet étudié. Sept critères de performance calculés pour chacun des neuf standards ont permis de valider la méthode. Celle-ci a été utilisée pour analyser des hydrolysats de gomme de caroube.

Les résultats de ce travail sont les premiers d'une nouvelle thématique de recherche. Ils laissent entrevoir de nombreuses possibilités et applications futures.

## ABSTRACT

The general framework of this study is the discovery of prebiotics and more specifically the production of oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of locust bean gum. These, though not much studied, could present a rich prebiotics potential.

The aim of this work was the purification of  $\beta$ -mannanases located in germinating carob seeds as well as the validation of a AEC-PAD method applicable to the analysis of locust bean gum hydrolysates.

Therefore, it has permitted to establish a concentration and purification procedure of  $\beta$ -mannanases and to determine a suitable preservation method of enzymatic extracts.

An original method to evaluate the enzymatic activity by viscosity measurements has also been developed and permits the study of the evolution of enzymatic activities during germination.

The validation method of characterization and quantification of (galacto)-manno-oligosaccharides constitutes the last part studied. Seven performance criteria calculated for each of the nine standards were used to validate the method. It has then been used to analyze locust bean gum hydrolysates.

The results of this work are the first of a new research theme. They offer many opportunities and future applications.

# TABLE DES MATIERES

|          |   |    |
|----------|---|----|
| I        | INTRODUCTION .....  | 1  |
| II       | SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....  | 2  |
| II.1     | Le caroubier .....  | 2  |
| II.1.1   | Description du caroubier .....  | 2  |
| II.1.2   | Description de la caroube .....                                       | 3  |
| II.1.3   | Situation économique de la caroube.....                               | 4  |
| II.2     | La gomme de caroube .....   | 5  |
| II.2.1   | Extraction et purification de la gomme de caroube.....                | 5  |
| II.2.2   | Structure et composition de la gomme de caroube.....                  | 7  |
| II.2.2.1 | Composition chimique de la gomme de caroube .....                     | 7  |
| II.2.2.2 | Les galactomannanes .....   | 8  |
| II.2.3   | Propriétés de solubilité et de viscosité de la gomme de caroube ..... | 10 |
| II.3     | Germination de la graine de caroube et production d'enzymes.....      | 12 |
| II.4     | Hydrolyse enzymatique de la gomme de caroube .....                    | 14 |
| II.4.1   | Les $\beta$ -mannanases .....   | 15 |
| II.4.2   | Les $\beta$ -mannosidases .....                                       | 17 |
| II.4.3   | Les $\alpha$ -galactosidases .....                                    | 18 |
| II.5     | Les (galacto)-manno-oligosaccharides .....                            | 19 |
| II.5.1   | Description des galacto-manno-oligosaccharides .....                  | 19 |
| II.5.2   | Propriétés prébiotiques des manno-oligosaccharides.....               | 19 |
| III      | OBJECTIFS .....   | 22 |
| IV       | MATERIEL ET METHODES .....  | 23 |
| IV.1     | Caractérisation de la gomme de caroube brute et purifiée.....         | 23 |
| IV.1.1   | Purification de la gomme de caroube .....                             | 23 |
| IV.1.2   | Paramètres étudiés.....   | 24 |
| IV.1.2.1 | Matières sèches .....   | 24 |
| IV.1.2.2 | Etude de la solubilité.....   | 24 |
| IV.1.2.3 | Composition en monosaccharides.....                                   | 25 |
| IV.1.2.4 | Etude rhéologique .....   | 26 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| IV.2     | Mesure de l'activité enzymatique $\beta$ -mannanase .....  | 27 |
| IV.2.1   | Mesure colorimétrique de l'activité enzymatique .....  | 27 |
| IV.2.2   | Mise au point d'une méthode d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de viscosité .....           | 28 |
| IV.2.2.1 | Préparation des blancs .....   | 29 |
| IV.2.2.2 | Préparation des témoins .....  | 29 |
| IV.2.2.3 | Préparation des solutions de germes, de cotylédons et d'endospermes .....                                  | 29 |
| IV.3     | Extraction et purification des $\beta$ -mannanases de graines de caroube en germination .....              | 30 |
| IV.3.1   | Germination des graines de caroube .....   | 30 |
| IV.3.2   | Extraction des $\beta$ -mannanases .....   | 31 |
| IV.3.3   | Concentration et purification des $\beta$ -mannanases .....  | 31 |
| IV.3.4   | Etude de la stabilité de l'activité enzymatique .....  | 33 |
| IV.3.4.1 | Conservation des extraits enzymatiques .....   | 33 |
| IV.3.4.2 | Dépistage de l'activité protéase .....   | 33 |
| IV.4     | Mise au point et validation d'une méthode d'analyse des (galacto)-manno-oligosaccharides par AEC-PAD ..... | 34 |
| IV.4.1   | Standards .....  | 34 |
| IV.4.2   | Appareillage et conditions AEC-PAD .....   | 34 |
| IV.4.3   | Description des critères de validation .....   | 35 |
| IV.4.3.1 | Droite d'étalonnage et linéarité .....   | 35 |
| IV.4.3.2 | Limite de détection .....  | 35 |
| IV.4.3.3 | Limite de quantification .....   | 35 |
| IV.4.3.4 | Répétabilité de l'injection .....  | 36 |
| IV.4.3.5 | Reproductibilité de l'injection .....  | 36 |
| IV.4.3.6 | Justesse .....   | 36 |
| IV.4.3.7 | Résolution des pics .....  | 36 |
| IV.5     | Analyse enzymatique .....  | 37 |
| IV.5.1   | Optimisation des paramètres d'hydrolyse .....  | 37 |
| IV.5.2   | Tests d'hydrolyse .....  | 37 |
| V        | RESULTATS ET DISCUSSIONS .....   | 38 |
| V.1      | Caractérisation de la gomme brute et de la gomme purifiée .....  | 38 |
| V.1.1    | Matières sèches .....  | 39 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| V.1.2   | Etude de la solubilité .....  | 39 |
| V.1.3   | Composition en monosaccharides .....  | 41 |
| V.1.4   | Etude rhéologique .....   | 43 |
| V.1.4.1 | Propriétés d'écoulement.....  | 43 |
| V.1.4.2 | Propriétés viscoélastiques .....  | 45 |
| V.1.5   | Conclusion.....   | 46 |
| V.2     | Extraction et purification des $\beta$ -mannanases de graines de caroube en germination.....              | 47 |
| V.2.1   | Protocole d'extraction et de purification des $\beta$ -mannanases.....                                    | 47 |
| V.2.1.1 | Extraction des $\beta$ -mannanases.....   | 48 |
| V.2.1.2 | Concentration de l'activité $\beta$ -mannanase.....   | 48 |
| V.2.1.3 | Purification des $\beta$ -mannanases.....   | 49 |
| V.2.2   | Etude de la stabilité de l'activité enzymatique .....   | 50 |
| V.2.2.1 | Conservation de l'extrait enzymatique .....   | 50 |
| V.2.2.2 | Dépistage de l'activité protéase .....  | 52 |
| V.2.3   | Conclusion.....   | 52 |
| V.3     | Mise au point d'une méthode d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la viscosité .....       | 53 |
| V.3.1   | Mise au point des paramètres d'analyse.....   | 53 |
| V.3.2   | Mise au point des mesures .....   | 53 |
| V.3.2.1 | Les blancs.....   | 54 |
| V.3.2.2 | Les enzymes commerciales.....   | 54 |
| V.3.2.3 | Les radicules, les cotylédons et les endospermes.....   | 55 |
| V.3.3   | Evaluation de l'activité enzymatique .....  | 57 |
| V.4     | Etude de la production enzymatique au cours du temps de germination.....                                  | 57 |
| V.4.1   | Etude de la production enzymatique des radicules .....  | 58 |
| V.4.2   | Etude de la production enzymatique des cotylédons .....   | 59 |
| V.4.3   | Etude de la production enzymatique des endospermes.....   | 60 |
| V.4.4   | Conclusion.....   | 61 |
| V.5     | Mise au point et validation d'une méthode d'analyse des (galacto)-manno-oligosaccharides par AEC-PAD..... | 62 |
| V.5.1   | Gradient d'élution .....  | 62 |
| V.5.2   | Critères de validation .....  | 64 |
| V.5.2.1 | Droite d'étalonnage et linéarité.....   | 64 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| V.5.2.2 | Limite de détection .....  | 65 |
| V.5.2.3 | Limite de quantification .....   | 65 |
| V.5.2.4 | Répétabilité de l'injection .....  | 65 |
| V.5.2.5 | Reproductibilité de l'injection .....  | 65 |
| V.5.2.6 | Justesse.....  | 65 |
| V.5.2.7 | Résolution des pics .....  | 66 |
| V.5.3   | Conclusion.....  | 66 |
| V.6     | Analyse enzymatique .....  | 67 |
| V.6.1   | Optimisation des paramètres d'hydrolyse .....                                      | 67 |
| V.6.2   | Analyse des extraits enzymatiques.....   | 68 |
| V.6.3   | Cinétique d'hydrolyse de la gomme de caroube purifiée à température ambiante ..... | 70 |
| V.6.4   | Conclusion.....  | 71 |
| VI      | CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....  | 73 |
| VII     | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....  | 75 |
| VIII    | ANNEXES .....  | 80 |



# LISTE DES ABREVIATIONS

|                 |   |
|-----------------|---|
| $\alpha$ :      | Alpha   |
| $\beta$ :       | Béta  |
| $\delta$ :      | Largeur des pics à mi-hauteur   |
| $\eta$ :        | Viscosité apparente   |
| $\mu\text{g}$ : | Microgramme   |
| $\mu\text{l}$ : | Microlitre  |
| $\mu\text{m}$ : | Micromètre  |
| $\tau$ :        | Contrainte tangentielle   |
| AEC-PAD :       | Anion Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection                           |
| BSA :           | Bovin Serum Albumin   |
| cm :            | Centimètre  |
| CPG :           | Chromatographie en Phase Gazeuse  |
| Culot 80 :      | Culot issu de l'extraction à 80°C   |
| Culot RT :      | Culot issu de l'extraction à température ambiante                                       |
| °C :            | Degré Celsius   |
| D :             | Gradient de vitesse   |
| Da :            | Dalton  |
| DEA :           | Diplôme d'Etudes Approfondies   |
| DMSO :          | Diméthylsulfoxyde   |
| DP :            | Degré de Polymérisation   |
| E :             | Potentiel   |
| EC :            | Enzyme commission numbers   |
| FAO :           | Food and Agriculture Organisation (Organisation de l'agriculture et de l'alimentation)  |
| F $\eta$ :      | Gradient de vitesse nécessaire pour abaisser la viscosité initiale de 1 unité           |
| Fr :            | Facteur de réponse  |
| G :             | Galactose   |
| g :             | Gramme  |
| g :             | Accélération de la pesanteur (9,81m/s <sup>2</sup> )                                    |
| G' :            | Module d'élasticité   |
| G'' :           | Module de viscosité   |
| Gal1Man2 :      | Galactosyl-mannobiose   |
| Gal2Man5 :      | Di-galactosyl-mannopentaose   |
| GB :            | Gomme de caroube brute  |
| GC :            | Gaz Chromatography  |
| GMOS :          | Galacto-manno-oligosaccharide   |
| GP80 :          | Gomme de caroube purifiée à 80°C  |
| GPRT :          | Gomme de caroube purifiée à température ambiante  |
| h :             | Heure   |
| HPAEC-PAD :     | High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection       |
| Hz :            | Hertz   |
| IUB-IUPAC :     | International Union of Biochemistry - International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LBG :           | Locust Bean Gum (gomme de caroube)  |
| LOD :           | Limit Of Detection (limite de détection)  |
| LOQ :           | Limit Of Quantification (limite de quantification)                                      |
| M :             | Mannose   |
| m :             | Mètre   |
| M :             | Molaire   |
| Man2 :          | Mannobiose  |
| Man3 :          | Mannotriose   |
| Man4 :          | Mannotetraose   |

|                     |  |
|---------------------|--|
| Man5 :              | Mannopentaose  |
| Man6 :              | Mannohexaose   |
| M <sub>éch</sub> :  | Masse d'échantillon injectée exprimée en matière sèche |
| mg :                | Milligramme  |
| min :               | Minute   |
| ml :                | Millilitre   |
| mm :                | Millimètre   |
| mM :                | Millimolaire   |
| M <sub>mono</sub> : | Masse du standard de monosaccharide                    |
| mol :               | Mole   |
| MOS :               | Manno-oligosaccharide                                  |
| MS :                | Matière Sèche  |
| ms :                | Milliseconde   |
| M <sub>si</sub> :   | Masse de standard interne                              |
| n.d :               | Non déterminé  |
| n° :                | Numéro   |
| nm :                | Nanomètre  |
| Pa :                | Pascal   |
| Pa.s :              | Pascal seconde   |
| pH :                | Potentiel hydrogène                                    |
| PP :                | Polypropylène  |
| ppm :               | partie par million                                     |
| psi :               | Pound per square inch                                  |
| R :                 | Coefficient de résolution                              |
| R <sup>2</sup> :    | Coefficient de détermination                           |
| RMN :               | Résonance Magnétique Nucléaire                         |
| RT :                | Room temperature (température ambiante)                |
| s :                 | Seconde  |
| SCE :               | Somme des Carrés des Ecart                             |
| S <sub>mono</sub> : | Aire du pic du standard de monosaccharide              |
| S <sub>si</sub> :   | Aire du pic de standard interne                        |
| tr :                | Temps de rétention                                     |
| U :                 | Unité d'activité enzymatique                           |
| UK :                | United Kingdom   |
| UV :                | Ultra Violet   |
| V :                 | Volt   |
| w/v :               | Weight/volume (Rapport poids/volume)                   |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Illustration des feuilles de caroubier, de la caroube et de ses graines (THOME, 1885).<br>.....   | 2  |
| Figure 2. Coupe transversale d'une graine de caroube (DAKIA <i>et al.</i> , 2008).....  | 4  |
| Figure 3. Schéma du process d'extraction et de purification de la gomme de caroube (KAWAMURA, 2008). ....   | 6  |
| Figure 4. Structure des galactomannanes de la gomme de caroube et de la gomme tara (SITTIKIYOTHIN <i>et al.</i> , 2005). ....   | 8  |
| Figure 5. Distribution des résidus galactoses sur la chaîne de mannoses (DEA <i>et al.</i> , 1975). (a) répartition régulière, (b) répartition aléatoire, (c) répartition en blocs uniformes. ....  | 9  |
| Figure 6. Evolution de l'activité $\beta$ -mannanase au cours de la germination pour les graines de luzerne, de caroube et les radicules de soja (MCCLEARY <i>et al.</i> , 1975). Les ronds blancs illustrent la $\beta$ -mannanase de caroube, les triangles blancs celle de luzerne et les triangles noirs celle de soja. ....  | 12 |
| Figure 7. Evolution des taux de galactomannanes, de monosaccharides, de disaccharides et d'oligosaccharides en fonction du temps de germination de la graine de caroube (MCCLEARY <i>et al.</i> , 1974). Les ronds noirs représentent les galactomannanes, les ronds blancs les monosaccharides, les triangles les oligosaccharides et les croix les disaccharides.....   | 13 |
| Figure 8. Evaluation des quantités de galactose et mannose produites par hydrolyse et des quantités réellement retrouvées dans les graines de caroube en germination (MCCLEARY <i>et al.</i> , 1976a). Les droites en traits pleins présentent les quantités calculées de mannose et de galactose relâchées par l'hydrolyse des galactomannanes. Les droites en pointillés représentent les quantités de galactose et de mannose retrouvées dans les graines.....   | 14 |
| Figure 9. Illustration de l'action d'une $\beta$ -mannanase et d'une $\alpha$ -galactosidase sur un galactomannane (BEWLEY, 1997). ....   | 15 |
| Figure 10. Mode d'action de la $\beta$ - mannanse d' <i>Aspergillus niger</i> en fonction de la distribution des galactoses substitués de différents galactomannanes (DAAS <i>et al.</i> , 2000). (A) distribution ordonnée, (B) distribution aléatoire, (C) présence de zones non-substituées. Les cercles noirs représentent les mannoses substitués et les cercles blancs les mannoses non-substitués. Les petits cercles noirs illustrent les galactoses. La flèche blanche indique l'endroit où l'enzyme clive. .... | 16 |
| Figure 11. Mode d'action de la $\beta$ -mannanase d' <i>Aspergillus niger</i> (MCCLEARY, 1988).....   | 17 |
| Figure 12. Mode d'action de la $\beta$ -mannanase de guar (MCCLEARY, 1988). ....  | 17 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 13. Schéma récapitulatif de la procédure de purification de la gomme de caroube brute.   | 23 |
| Figure 14. Droite d'étalonnage de l'activité $\beta$ -mannanase à pH 4,6 et à 40°C.   | 28 |
| Figure 15. Illustration de la mise en germination des graines de caroube.   | 30 |
| Figure 16. Dispositifs d'ultrafiltration et de filtration sur gel.  | 31 |
| Figure 17. Cinétique de solubilité dans l'eau à température ambiante des gommages de caroube brute et purifiées (GB = gomme de caroube brute, GPRT = gomme de caroube purifiée à température ambiante, GP80 = gomme de caroube purifiée à 80°C).  | 40 |
| Figure 18. Cinétique de solubilité dans l'eau à 80°C des gommages de caroube brute et purifiées (GB = gomme de caroube brute, GPRT = gomme de caroube purifiée à température ambiante, GP80 = gomme de caroube purifiée à 80°C).  | 40 |
| Figure 19. Propriétés d'écoulement de la gomme de caroube brute (GB) et des gommages purifiées extraites à température ambiante (GPRT) et à 80°C (GP80) : A) courbe d'écoulement à température ambiante, B) courbe d'écoulement à 80°C, C) courbe de viscosité à température ambiante, D) courbe de viscosité à 80°C. | 43 |
| Figure 20. Propriétés de viscosité à 20°C et à 80°C de la gomme de caroube purifiée à température ambiante (GPRT).  | 45 |
| Figure 21. Schéma récapitulatif de la procédure de concentration et de purification des $\beta$ -mannanases.  | 47 |
| Figure 22. Influence de la technique de conservation sur l'activité $\beta$ -mannanase au cours du temps. (F = réfrigérateur + azide de Na, F BSA = réfrigérateur + azide de Na + BSA, C = congélateur + azide de Na, C BSA = congélateur + azide de Na + BSA).   | 51 |
| Figure 23. Tests de dépistage de l'activité protéase A) avec azide de Na B) sans azide de Na (B = blanc, P = papaïne et E = extrait enzymatique).   | 52 |
| Figure 24. Profil de viscosité des blancs. (blanc = solution de caroube 2%, blanc endosperme = endospermes désactivés par chauffage).   | 54 |
| Figure 25. Profil de viscosité des enzymes commerciales sur une solution de caroube 2%.   | 55 |
| Figure 26. Profil de viscosité des radicules et des cotylédons sur une solution de gomme de caroube 2%.   | 56 |
| Figure 27. Profil de viscosité des endospermes broyés dans un tampon acétate pH 4,6.  | 56 |
| Figure 28. Evolution des activités enzymatiques dans les radicules au cours du temps de germination par mesure de la viscosité.   | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 29. Evolution des activités enzymatiques dans les cotylédons au cours du temps de germination par mesure de la viscosité. ....  | 59 |
| Figure 30. Evolution des activités enzymatiques dans les endospermes au cours du temps de germination par mesure de la viscosité. .... | 60 |
| Figure 31. Chromatogramme AEC-PAD du mélange des neufs standards. ....   | 63 |
| Figure 32. Evolution de l'activité $\beta$ -mannanase en fonction de la température et du pH. ....                                     | 67 |
| Figure 33. Profil en oligosaccharides de l'extrait enzymatique secondaire dilué 50 fois.....   | 68 |
| Figure 34. Profil en oligosaccharides de l'extrait enzymatique final dilué 50 fois. ....   | 69 |
| Figure 35. Cinétique d'hydrolyse de la gomme de caroube purifiée à température ambiante par un extrait enzymatique secondaire. ....    | 70 |
| Figure 36. Cinétique d'hydrolyse de la gomme de caroube purifiée à température ambiante par un extrait enzymatique final. ....         | 71 |

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1. Production de caroubes dans le monde et pour le bassin méditerranéen de 2000 à 2008 (source : FAOSTAT). Les nombres noirs constituent des données officielles, les nombres rouges des estimations FAO et les nombres bleus peuvent inclure des données officielles, semi-officielles ou estimées. ....  | 4  |
| Tableau 2. Composition chimique (en %) de la gomme de caroube brute et purifiée (et LOPEZ DA SILVA <i>et al.</i> , 1990 ; ANDRADE <i>et al.</i> , 1999). ....  | 7  |
| Tableau 3. Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses (BRESOLIN <i>et al.</i> , 1997 ; GARTI <i>et al.</i> , 1997 ; Parvathy <i>et al.</i> , 2005 ). ....  | 9  |
| Tableau 4. Conditions de conservation testées pour l'étude de stabilité enzymatique. ....  | 33 |
| Tableau 5. Pourcentage de matière sèche pour les gommes brutes et purifiées.....   | 39 |
| Tableau 6. Composition en monosaccharides (%), en galactomannanes (%) et ratio mannose/galactose pour les gommes de caroube brute et purifiées et pour les culots de purification. (GB, gomme de caroube brute ; GPRT, gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante ; Culot RT, culot issu de l'extraction à température ambiante ; GP80, gomme de caroube purifiée extraite à 80°C ; Culot 80, culot issu de l'extraction à 80°C). ... | 41 |
| Tableau 7. Paramètres de la viscosité à température ambiante et à 80°C des trois types de gommes de caroube : brute (GB), purifiée extraite à température ambiante (GPRT) et purifiée extraite à 80°C (GP80). ....   | 44 |
| Tableau 8. Paramètres de viscoélasticité à température ambiante et à 80°C des trois types de gommes de caroube : brute (GB), purifiée extraite à température ambiante (GPRT) et purifiée extraite à 80°C (GP80). ....  | 45 |
| Tableau 9. Evolution de la somme des carrés des écarts au cours de la germination en fonction de l'activité enzymatique des radicules.....   | 58 |
| Tableau 10. Evolution de la somme des carrés des écarts au cours de la germination en fonction de l'activité enzymatique des cotylédons. ....  | 59 |
| Tableau 11. Evolution de la viscosité initiale en fonction du stade de germination des endospermes. ....   | 60 |
| Tableau 12. Evolution de l'activité $\beta$ -mannanase (U/ml) des extraits enzymatiques secondaires obtenus à différents stades de germination (8 <sup>ème</sup> et 9 <sup>ème</sup> jour. ....  | 61 |
| Tableau 13. Gradient d'élution de la méthode AEC-PAD d'analyse des (galacto)-manno-oligosaccharides. (solvant A = 100 mM NaOH, solvant B = 600 mM acétate de sodium + 100 mM NaOH, solvant C = 500 mM NaOH et solvant D = eau ultrapure). ....   | 62 |

|   |    |
|---|----|
| Tableau 14. Numéro de pic, pureté et temps de rétention moyen pour les neufs standards. ...   | 64 |
| Tableau 15. Equations des droites d'étalonnage et coefficient de corrélation pour les neufs standards.....  | 64 |
| Tableau 16. Limites de détection, limites de quantification, pourcentages de justesse et coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité pour les neufs standards..... | 66 |

# I INTRODUCTION

Les prébiotiques et les « aliments santé » font l'objet d'un engouement certain depuis quelques années. Le consommateur, soucieux de sa santé et de son bien-être, est convaincu de l'utilité d'améliorer son métabolisme par le biais de son alimentation. D'une manière générale, les prébiotiques sont des ingrédients ayant des effets bénéfiques sur la santé en influençant la composition et/ou l'activité de la microflore gastro-intestinale (WANG, 2009).

Ce travail de fin d'études s'inscrit dans cette thématique, en contribuant à la découverte de nouveaux prébiotiques et plus particulièrement ceux issus de la production d'oligosaccharides à partir de gomme de caroube.

La gomme de caroube a été sélectionnée comme substrat d'hydrolyse car peu de recherches ont été réalisées sur les propriétés prébiotiques des ses hydrolats. Son étude pourrait donc conduire, à long terme, à de nouveaux produits valorisables au niveau industriel.

La production d'oligosaccharides par voie enzymatique nécessite l'action d'une endo-hydrolase, une  $\beta$ -mannanase dans le cas de l'hydrolyse des galactomannanes contenus dans la gomme de caroube. Dans ce travail, les  $\beta$ -mannanases seront extraites de graines de caroube en germination. Leur mode d'action, méconnu, pourrait permettre l'obtention de profils en oligosaccharides originaux par rapport aux autres  $\beta$ -mannanases présentant des modes d'action différents.

Cette étude tentera dans un premier temps de purifier les  $\beta$ -mannanases de caroube de manière à mieux étudier leur mode d'action et leur conservation. Ensuite, le travail visera la mise en place d'une méthode AEC-PAD afin d'analyser les hydrolysats de gomme de caroube qui seront obtenus.

La première partie de ce travail sera consacrée à une synthèse bibliographique faisant état des connaissances au sujet de la gomme de caroube, des enzymes hydrolysant les galactomannanes, des (galacto)-manno-oligosaccharides et de leurs effets prébiotiques. Le deuxième chapitre détaillera les manipulations réalisées lors de cette étude. La troisième partie sera réservée à la présentation des résultats et à leurs traitements. Elle se subdivisera en plusieurs sections consacrées respectivement à la caractérisation du substrat d'hydrolyse, à l'obtention d'un extrait purifié et concentré de  $\beta$ -mannanases, à l'évaluation de l'activité enzymatique, à la mise au point et la validation d'une méthode d'analyse des (galacto)-manno-oligosaccharides par AEC-PAD et enfin à la réalisation de tests d'hydrolyse. Le dernier chapitre exposera les conclusions et les perspectives de ce mémoire.



## II SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique introduira de manière sommaire le caroubier et ses graines. Le deuxième chapitre sera dédié à la gomme de caroube que l'on peut extraire de l'endosperme de la graine. Une attention particulière sera portée à son extraction, sa purification, sa composition et sa structure ainsi qu'à ses propriétés de solubilité et de viscosité. Les troisième et quatrième sections seront consacrées à la description de la germination et des enzymes dégradant les galactomannanes. Le dernier volet s'intéressera aux oligosaccharides obtenus par hydrolyse de la gomme de caroube et à leur potentiel prébiotique.

### II.1 LE CAROUBIER

#### II.1.1 DESCRIPTION DU CAROUBIER

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est un arbre dioïque à feuilles persistantes de la famille des *Caesalpiniaceae* (BINER *et al.*, 2007 ; BOUZOUITA *et al.*, 2007). On le retrouve dans la région méditerranéenne principalement en Espagne, en Italie, en Grèce, au Portugal et au Maroc (BINER *et al.*, 2007 ; DAKIA *et al.*, 2008). Cependant, il est originaire des pays arabes (PETIT *et al.*, 1995).



Figure 1. Illustration des feuilles de caroubier, de la caroube et de ses graines (THOME, 1885).

Le caroubier présente une bonne résistance à la sécheresse mais est sensible au froid (BINER *et al.*, 2007). Il peut atteindre une taille allant de 8 à 15 m et vivre jusqu'à 500 ans. Il s'agit d'une essence thermophile retrouvée sur les pentes arides. Les caroubiers constituent un outil de lutte contre la déforestation et la désertification, en limitant l'érosion des sols (CORREIA *et al.*, 2005 ; BINER *et al.*, 2007).

Le caroubier est cultivé pour son fruit, la caroube et pour les graines contenues dans celle-ci.

### **II.1.2 DESCRIPTION DE LA CAROUBE**

Le fruit du caroubier, nommé caroube, est une gousse indéhiscence de 10 à 30 cm de longueur sur quelques centimètres de largeur. A maturité, la caroube change de couleur et devient brune (figure 1). Ses composants majeurs sont la pulpe et les graines.

La composition de la pulpe de caroube dépend de la variété, du climat et des techniques de cultures. Toutefois, on peut avancer que la pulpe de caroube représente 90% de la masse du fruit. Elle est riche en tanins et en sucres, dont le saccharose représente 65 à 75% des sucres totaux. Quant aux taux de protéines et de lipides, ils sont faibles (PETIT *et al.*, 1995).

La caroube, dépourvue de ses graines, est un édulcorant naturel utilisé comme substitut du cacao et du chocolat. Elle présente l'avantage d'être exempte de théobromine et de caféine contrairement au cacao et au chocolat qui en contiennent des quantités importantes (YOUSIF *et al.*, 2000).

Les principales applications de la pulpe de caroube sont l'alimentation animale et humaine en tant que substitut du cacao (BINER *et al.*, 2007). Par exemple, dans de nombreux pays arabes, une boisson consommée lors du Ramadan est fabriquée à partir de caroube (YOUSIF *et al.*, 2000). La pulpe de caroube est souvent consommée sous forme de poudre (DAKIA *et al.*, 2007). Dans les pays occidentaux, celle-ci est produite par égrenage, concassage, broyage et torréfaction des gousses de caroube (YOUSIF *et al.*, 2000). La production de produits pharmaceutiques, d'éthanol et l'extraction de sucres sont d'autres applications industrielles de la caroube (PETIT *et al.*, 1995).

Quant aux graines, elles constituent environ 10% de sa masse (PETIT *et al.*, 1995 ; BOUZOUTA *et al.*, 2007). Leur nombre varie généralement entre 10 et 15. Les graines de caroube ont longtemps été employées comme unité de mesure des diamants et des pierres précieuses. Un carat correspond à la masse d'une graine de caroube soit environ 200 mg (DAKIA *et al.*, 2003).

La graine de caroube est recouverte d'une enveloppe résistante de couleur brune : les téguments (DAKIA *et al.*, 2007 ; DAKIA *et al.*, 2008). En-dessous de ceux-ci se trouve l'endosperme (figure 2). Il est majoritairement constitué de galactomannanes (DAAS *et al.*, 2000). Après diverses étapes de purification de l'endosperme, la gomme de caroube est obtenue (section II.2.1).

On remarque également la présence d'une radicule (figure 2). Celle-ci possède une valeur énergétique élevée due à son taux important de protéines principalement solubles dans l'eau et de lipides majoritairement insaturés. Elle est employée pour la nutrition du bétail et comme aliment diététique (DAKIA *et al.*, 2007).

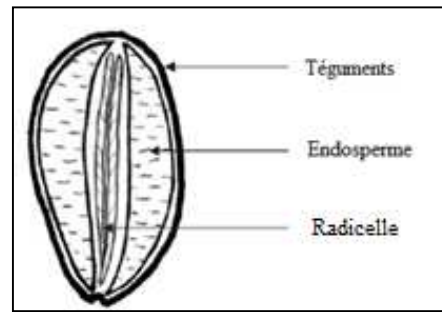


Figure 2. Coupe transversale d'une graine de caroube (DAKIA *et al.*, 2008).

Les graines de caroube sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour leur contenu en gomme (AVALLONE *et al.*, 1997). La structure et les propriétés de la gomme de caroube seront détaillées à la section II.2.

### II.1.3 SITUATION ECONOMIQUE DE LA CAROUBE

On estime à plus de 15000 tonnes la production mondiale annuelle de gomme de caroube (DAKIA *et al.*, 2008).

Les données reprises ci-après sont issues des statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). Les statistiques comprennent les fruits mais également les graines de caroubes.

En termes de surface cultivée, la culture du caroubier représente un peu plus de 100000 hectares (102939 hectares en 2008) à travers le monde. L'Espagne, le Maroc et le Portugal possèdent les surfaces cultivées les plus importantes, de l'ordre de 60000, 12000 et 10000 hectares respectivement.

Enfin, le tableau 1 présente la production de caroubes dans le monde et pour le bassin méditerranéen de ces dernières années.

**Tableau 1. Production de caroubes dans le monde et pour le bassin méditerranéen de 2000 à 2008** (source : FAOSTAT). Les nombres noirs constituent des données officielles, les nombres rouges des estimations FAO et les nombres bleus peuvent inclure des données officielles, semi-officielles ou estimées.

| Pays         | Production (tonnes) |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|              | 2000                | 2001   | 2002   | 2003   | 2004   | 2005   | 2006   | 2007   | 2008   |
| Espagne      | 93863               | 73211  | 74736  | 67403  | 79200  | 64100  | 70000  | 72000  | 72000  |
| Italie       | 38079               | 16282  | 24015  | 18637  | 19060  | 31665  | 26110  | 32784  | 31224  |
| Grèce        | 20192               | 16464  | 15015  | 14789  | 14594  | 14815  | 14506  | 15000  | 15000  |
| Maroc        | 23000               | 24000  | 24000  | 25000  | 25000  | 25000  | 25000  | 25000  | 25000  |
| Portugal     | 20000               | 20000  | 20000  | 20000  | 20000  | 20000  | 22000  | 23000  | 23000  |
| Turquie      | 14000               | 13500  | 13500  | 14000  | 14000  | 12000  | 12388  | 12161  | 12100  |
| Chypre       | 7300                | 2850   | 7200   | 6550   | 6250   | 6942   | 5650   | 3839   | 3915   |
| <b>Monde</b> | 226829              | 177787 | 188070 | 174365 | 186595 | 181830 | 184115 | 193250 | 191167 |

## II.2 LA GOMME DE CAROUBE

La gomme de caroube est composée principalement de galactomannanes. Il s'agit de polysaccharides de réserve que l'on retrouve dans l'endosperme translucide de nombreuses graines de plantes légumineuses dont celles de caroube (DAAS *et al.*, 2000). Différents procédés industriels permettent l'obtention de gomme de caroube à partir de graines de caroube (LOPEZ DA SILVA *et al.*, 1990 ;).

En anglais, la gomme de caroube est traduite « carob bean gum » ou plus couramment « locust bean gum » (LBG). En tant qu'additif, la gomme de caroube est appelée E410. Elle est commercialisée sous forme de poudre blanchâtre (DAKIA *et al.*, 2003).

On retrouve des applications de la gomme de caroube dans le secteur alimentaire en tant qu'additif et dans les domaines non-alimentaires (DAKIA *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les industries agroalimentaires, la gomme de caroube est utilisée dans de nombreux produits. On la rencontre dans les crèmes glacées en tant que stabilisant (PATMORE *et al.*, 2003) ainsi que dans les soupes, les sauces, les bonbons, les aliments pour bébés, les produits laitiers, les boissons alcoolisées et non-alcoolisées, les aliments pour bétail, etc. (BINER *et al.*, 2007 ; KAWAMURA, 2008). Dans les produits de boulangerie, l'ajout de gomme de caroube prévient ou retarde la rétrogradation des amidons et des amidons modifiés (WIELINGA, 1990).

Les autres applications industrielles de la gomme de caroube sont les papeteries, les industries cosmétiques, textiles et pharmaceutiques (BINER *et al.*, 2007 ; BOUZOUTA *et al.*, 2007 ; VIERA *et al.*, 2007 ; VENDRUSCOLO *et al.*, 2009).

Dans cette section, les méthodes d'extraction et de purification ainsi que la structure, la composition et les propriétés de la gomme de caroube seront abordées.

### II.2.1 EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA GOMME DE CAROUBE

KAWAMURA (2008) expose un procédé général d'extraction et de purification de la gomme de caroube à partir des gousses et plus spécifiquement des graines de caroube (figure 3). La mise en œuvre d'un tel protocole est difficile en raison de la solidité et de la dureté de l'enveloppe brune recouvrant les graines.

Premièrement, les gousses de caroube sont concassées et les graines récupérées.

Deuxièmement, les téguments des graines sont enlevés. Pour se faire, deux procédés distincts peuvent être utilisés. Le premier consiste à carboniser les enveloppes coriaces à l'aide d'un traitement à l'acide sulfurique. Un lavage et un brossage permettent l'élimination des fragments restants. Ce processus permet l'obtention d'une gomme de caroube blanche et de haute viscosité. Le second procédé repose sur l'éclatement plus ou moins complet de l'enveloppe par rôtiage. Celle-ci se détache du reste de la graine. La gomme de caroube obtenue est un peu plus foncée (DAKIA *et al.*, 2008 ; KAWAMURA, 2008).

Ensuite, les radicules sont écrasées par broyage mécanique et enlevées principalement par tamisage. Il ne reste alors plus que les endospermes qui sont broyés en fines particules. La gomme de caroube (carob bean gum) est obtenue.

Par ailleurs, la gomme de caroube peut subir différentes étapes de clarification. Dans ce cas, elle est solubilisée dans l'eau par augmentation de la température. Le matériel insoluble est ensuite éliminé à l'aide d'une étape de filtration.

Enfin, la gomme de caroube est précipitée à l'aide d'éthanol ou d'isopropanol. Le précipité est récupéré par filtration, séché et broyé en fines particules. La gomme de caroube obtenue est dite clarifiée (extraite et purifiée) (KAWAMURA, 2008).

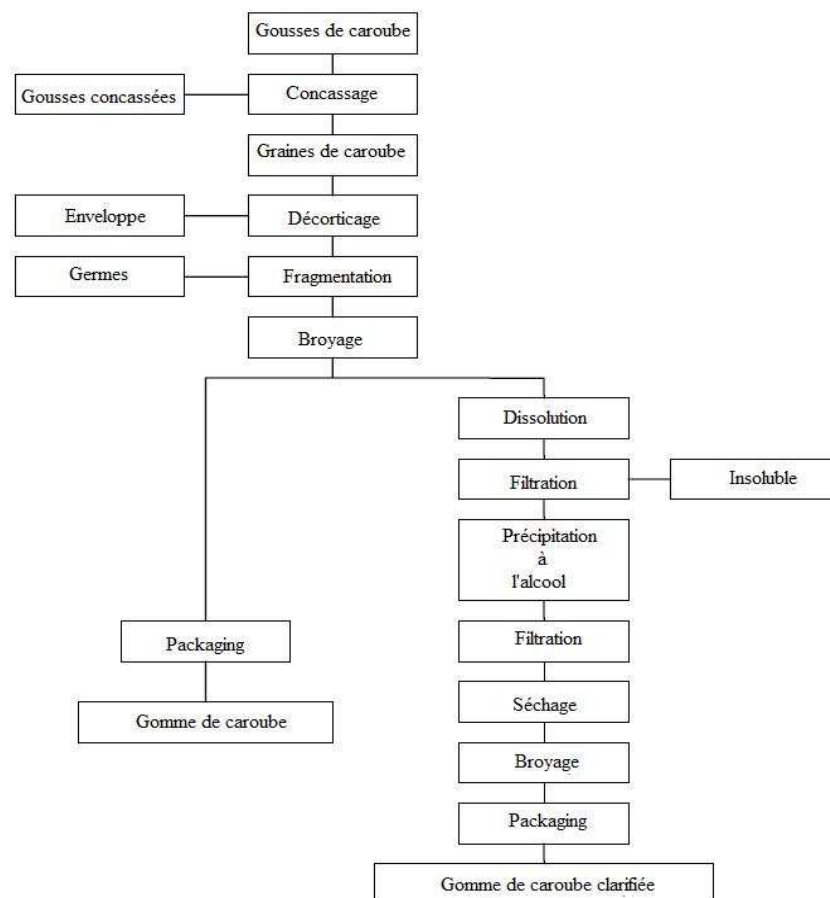


Figure 3. Schéma du process d'extraction et de purification de la gomme de caroube (KAWAMURA, 2008).

D'autres techniques d'extraction et de purification de la gomme de caroube existent dans la littérature. Ainsi, LOPEZ DA SILVA *et al.* (1990) citent la purification au méthanol ou à l'aide de complexes de cuivre ou de baryum.

L'état de purification a une grande influence sur la composition et les propriétés de la gomme de caroube.

## **II.2.2 STRUCTURE ET COMPOSITION DE LA GOMME DE CAROUBE**

La gomme de caroube étant composée en grande majorité de galactomannanes, ses propriétés sont globalement semblables aux propriétés des galactomannanes qui la constituent. Ainsi, dans cette section, les deux dénominations seront considérées comme synonymes.

### **II.2.2.1 COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GOMME DE CAROUBE**

LOPEZ DA SILVA *et al.* (1990) et ANDRADE *et al.* (1999) ont déterminé la composition chimique d'une gomme de caroube commerciale brute et purifiée par précipitation à l'isopropanol (section II.2.1). Leurs résultats sont présentés dans le tableau 2. Ils sont exprimés en pourcentage de poids sec, mis à part l'humidité exprimée en poids humide.

De manière générale, la gomme de caroube brute contient environ 93% de galactomannanes, 4% de protéines, 1% de cellulose et de lignine, 1% de lipides et 1% de minéraux. La purification par précipitation à l'isopropanol permet d'éliminer les fibres (cellulose et lignine) et les lipides et de diminuer considérablement les quantités de minéraux et de protéines (LOPEZ DA SILVA *et al.*, 1990).

**Tableau 2. Composition chimique (en %) de la gomme de caroube brute et purifiée (et LOPEZ DA SILVA *et al.*, 1990 ; ANDRADE *et al.*, 1999).**

|                      | LOPEZ DA SILVA <i>et al.</i> |              | ANDRADE <i>et al.</i> |              |
|----------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|--------------|
|                      | LBG brute                    | LBG purifiée | LBG brute             | LBG purifiée |
| Humidité             | 8,49 ± 0,03                  | 12,70 ± 0,03 | 11,3                  | 7,5          |
| Cendres              | 0,71 ± 0,01                  | 0,25 ± 0,01  | 0,95                  | 0,28         |
| Protéines            | 4,66 ± 0,33                  | 0,78 ± 0,01  | 4,64                  | 0,64         |
| Lipides              | 0,92 ± 0,08                  | traces       | n.d                   | n.d          |
| Cellulose et lignine | 1,55 ± 0,08                  | 0,19 ± 0,04  | n.d                   | n.d          |
| Galactomannanes      | 92,2                         | 98,8         | 94,4                  | 99,1         |

## II.2.2.2 LES GALACTOMANNANES

Les galactomannanes sont des hémicelluloses présentant une haute masse moléculaire située entre 30000 et 300000 g/mol (McCLeary *et al.*, 1976b ; MOREIRA *et al.*, 2008). Ils sont composés d'une chaîne principale de résidus D-mannopyranoses liés en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) sur laquelle se greffent des résidus D-galactopyranoses uniques grâce à une liaison de type  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (McCLeary, 1980 ; MOREIRA *et al.*, 2008). La structure du galactomannane de la gomme de caroube est illustrée à la figure 4.

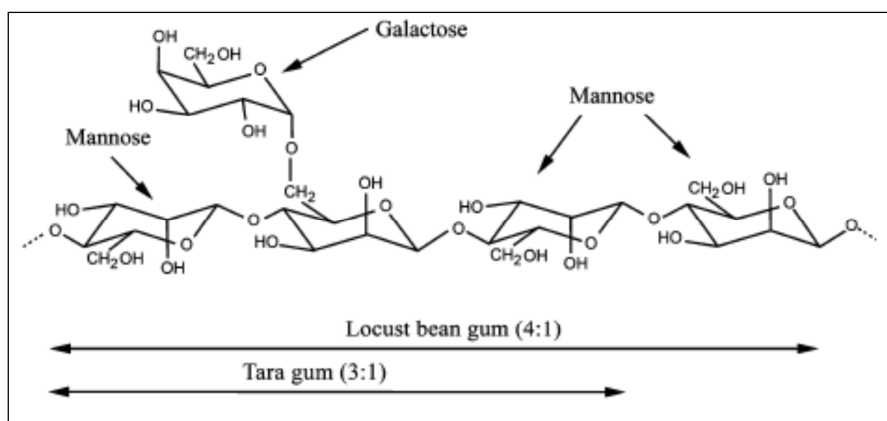


Figure 4. Structure des galactomannanes de la gomme de caroube et de la gomme tara (SITTIKIYOTHIN *et al.*, 2005).

Suivant l'origine botanique de la gomme, il existe différents galactomannanes se distinguant par le poids moléculaire, le ratio mannose/galactose et la distribution des résidus D-galactopyranoses sur le squelette mannane (McCLeary, 1980 ; MOREIRA *et al.*, 2008 ; VENDRUSCOLO *et al.*, 2009).

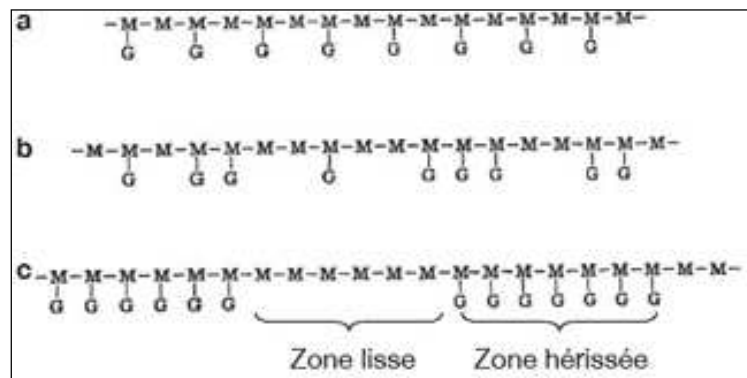
Tout d'abord, le ratio mannose/galactose peut varier de 10 à 1 en fonction de l'espèce végétale (DAAS *et al.*, 2000). La gomme de caroube possède un des plus faibles taux de galactose (DAKIA *et al.*, 2008). En effet, son ratio mannose/galactose est de 4 : 1, alors que pour la gomme de guar et la gomme tara, il est de 2 : 1 et 3 :1 respectivement (PARVATHY *et al.*, 2005). Le tableau 3 présente les rapports mannose/galactose de différentes légumineuses.

Le rapport mannose/galactose d'un galactomannane peut varier au sein d'une même espèce. Il est dépendant des conditions climatiques, de la composition du sol, de la variété et de l'âge de l'arbre (DAKIA *et al.*, 2009). Il peut aussi être influencé par les procédés d'extraction et de purification de la gomme (SITTIKIYOTHIN *et al.*, 2005) (section II.2.1).

**Tableau 3. Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses (BRESOLIN *et al.*, 1997 ; GARTI *et al.*, 1997 ; Parvathy *et al.*, 2005 ).**

| Source  | Ratio Man/Gal | Référence                     |
|---|---------------|-------------------------------|
| <i>Schizolobium parahybum</i>                           | 3 : 1         | BRESOLIN <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Mimosa scrabella</i>                                 | 1,1 : 1       | BRESOLIN <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Cyamopsis tetragonoloba</i><br>(gomme de guar)       | 2 : 1         | PARVATHY <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Caeselpinia spinosa</i><br>(gomme tara)              | 3 : 1         | PARVATHY <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Ceratonia siliqua</i><br>(gomme de caroube)          | 4 : 1         | PARVATHY <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Trigonella foenum-graecum</i><br>(gomme de fenugrec) | 1 : 1         | GARTI <i>et al.</i> (1997)    |

Le second paramètre susceptible de varier d'une gomme à l'autre est la distribution des résidus D-galactopyranoses sur la chaîne de D-mannopyranoses (DAAS *et al.*, 2000). Différents types de répartition peuvent être observés : la disposition régulière, la disposition aléatoire et la disposition en blocs uniformes (figure 5) (DAKIA *et al.*, 2009).



**Figure 5. Distribution des résidus galactoses sur la chaîne de mannoses (DEA *et al.*, 1975). (a) répartition régulière, (b) répartition aléatoire, (c) répartition en blocs uniformes.**

Dans le cas de la gomme de caroube, une distribution irrégulière des résidus galactoses est observée. Les galactomannanes de caroube présentent donc des zones sur lesquelles aucun résidu galactose n'est présent et d'autres plus riches en chaînes latérales d'unités simples de galactose (DAAS *et al.*, 2000). Pour les galactomannanes de *Schizolobium parahybum* et *Mimosa scabrella* et la gomme tara, la distribution apparaît aléatoire. En ce qui concerne la gomme de guar, les résidus D-galactopyranoses sont principalement dispersés de manière aléatoire. Cependant, quelques régions non-substituées pourraient être mises en évidence (ANDRADE *et al.*, 1999 ; DAAS *et al.*, 2000).



Le rapport mannose/galactose ainsi que la distribution des unités galactoses revêtent une importance considérable car ils ont la particularité d'influencer les propriétés technofonctionnelles (section II.2.3) (DAAS *et al.*, 2000 ; VIEIRA *et al.*, 2007). Ces deux paramètres ont également la particularité d'évoluer au cours de la germination. En effet, lors de cette phase, les galactomannanes sont dégradés par différentes enzymes et utilisés comme nutriment (DAAS *et al.*, 2000). La germination et le fonctionnement des enzymes seront abordés aux sections II.3 et II.4.

Différentes techniques ont été mises au point pour déterminer les ratios mannose/galactose et la distribution des résidus D-galactopyranoses.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet la détermination du ratio mannose/galactose d'un galactomannane. Il peut également être mis en évidence par « High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection » (HPAEC-PAD) après hydrolyse partielle ou totale.

La distribution des galactoses sur le squelette mannane est plutôt étudiée à l'aide de la diffraction rayons X, de la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par des études d'hydrolyse chimique ou enzymatique (DAAS *et al.*, 2000 ; VIEIRA *et al.*, 2007). Ce dernier point sera abordé de manière plus approfondie à la section II.4.

### **II.2.3 PROPRIETES DE SOLUBILITE ET DE VISCOSITE DE LA GOMME DE CAROUBE**

La gomme de caroube, la gomme de guar et la gomme tara constituent les trois principaux galactomannanes utilisés à l'échelle industrielle et notamment dans le domaine de l'agroalimentaire (DAAS *et al.*, 2000). Les propriétés rhéologiques des galactomannanes sont influencées par leurs masses moléculaires et par leurs structures, caractérisées par le ratio mannose/galactose et la distribution des résidus galactose (ANDRADE *et al.*, 1999).

Les propriétés de solubilité et de viscosité seront abordées dans ce chapitre.

La solubilité s'exprime par le biais d'un pourcentage mesurant la proportion du produit restant en solution suite à une centrifugation. Elle dépend des dissolutions préalables, de l'équilibre entre les interactions molécules-molécules et molécules-solvant, de la nature physico-chimique des molécules ainsi que de l'état physique de la matière (BLECKER, 2009).

La viscosité est définie comme étant la résistance d'un fluide à toute modification irréversible des éléments de son volume (SINDIC, 2009).

Le ratio mannose galactose ainsi que la distribution des galactoses substitués influencent la viscosité et la solubilité des galactomannanes.

Les zones des galactomannanes non-substituées par des galactoses sont responsables des interactions intra- et intermoléculaires grâce à l'intervention de ponts hydrogènes (BRUMMER *et al.*, 2003).

Du fait de ces liaisons, les galactomannanes pauvres en galactose présentent une viscosité plus élevée que les galactomannanes hautement substitués. Cependant, ils éprouvent des difficultés de solubilisation contrairement aux galactomannanes riches en galactose (DAKIA *et al.*, 2009).

En effet, les résidus galactopyranoses représentent les parties hydrophiles de la molécule de galactomannane. Plus le degré de substitution en galactose est élevé, plus la solubilité dans l'eau des galactomannanes est augmentée (KÖK *et al.*, 1999 ; MOREIRA *et al.*, 2008). Sans la présence de ces groupes galactopyranoses, le polysaccharide serait instable en solution et pourrait cristalliser ou précipiter (POLLARD *et al.*, 2007).

Grâce à sa teneur en galactose plus élevée, la gomme de guar est soluble dans l'eau froide alors que la gomme de caroube ne l'est pas. En effet, la gomme de caroube présente une faible solubilité dans l'eau à température ambiante. Un traitement thermique de chauffage sous forte agitation (85°C pendant 10 minutes par exemple) est nécessaire pour la solubiliser totalement (KÖK *et al.*, 1999).

En outre, les galactomannanes sont des liquides rhéofluidifiants. Lorsque le gradient de vitesse (exprimé en  $s^{-1}$ ) augmente, la viscosité apparente (exprimée en Pa.s) diminue. Sous un effet de cisaillement grandissant, les chaînes de galactomannanes vont se désenchevêtrer et s'orienter parallèlement. Cette réorganisation des molécules est responsable de la diminution de la viscosité. L'effet rhéofluidifiant est réversible (DAKIA *et al.*, 2009).

LOPEZ DA SILVA et GONCLAVES (1990) ont comparé les propriétés de solubilité et de viscosité de la gomme de caroube brute et purifiée. Ils ont pu observer que la gomme de caroube purifiée est plus soluble que la gomme brute. En effet, la purification permet l'élimination des composés insolubles et la gomme purifiée devient totalement soluble (98% contre 89% pour la gomme non clarifiée). En ce qui concerne la viscosité, les solutions de gomme brute présentent une viscosité plus élevée que les solutions de gomme purifiée à des concentrations similaires. Ce phénomène pourrait être expliqué par une dépolymérisation des macromolécules lors des étapes de purification ou par une agrégation inter-macromoléculaire due à l'augmentation de l'homogénéité des échantillons purifiés.

Il est à noter que la gomme de caroube est insoluble dans la plupart des solvants organiques, l'éthanol inclus. Elle peut également être précipitée des solutions aqueuses par des électrolytes comme l'acétate de plomb (KAWAMURA, 2008).

Enfin, grâce à leur capacité de liaison à l'eau, les galactomannanes sont capables de former des solutions très visqueuses même à de relativement faibles concentrations. Ces solutions visqueuses ne sont affectées que légèrement par le pH, les sels et les variations thermiques (LOPEZ DA SILVA *et al.*, 1990 ; DAAS *et al.*, 2000).

### II.3 GERMINATION DE LA GRAINE DE CAROUBE ET PRODUCTION D'ENZYMES

Tout d'abord, les galactomannanes jouent un rôle physiologique dans les graines. Ils retiennent l'eau par solvation. Dans les régions chaudes, leur présence est importante afin de prévenir une déshydratation complète des graines. Celle-ci pourrait conduire à la dénaturation des protéines, dont notamment les enzymes essentielles à la germination (MOREIRA *et al.*, 2008).

La germination de graines implique l'imprégnation préalable de la graine par de l'eau et se conclut par l'émergence de la radicule et son élongation. La germination est visible lorsque la radicule a pénétré les enveloppes de la graine entourant l'embryon (BEWLEY, 1997).

Chez les légumineuses, lors de la germination, trois enzymes différentes sont synthétisées pour dégrader les galactomannanes que l'on retrouve abondamment dans les parois des cellules de l'endosperme. Les  $\beta$ -mannanases, les  $\beta$ -mannosidases et les  $\alpha$ -galactosidases sont les trois enzymes nécessaires à l'hydrolyse des galactomannanes (BEWLEY, 1997).

L'évolution de l'activité  $\beta$ -mannanase au cours de la germination pour les graines de luzerne, de caroube et les radicules de soja a été investiguée par MCCLEARY *et al.* (1975) (figure 6). Pour la caroube, un pic d'activité apparaît aux environs du huitième jour de germination.

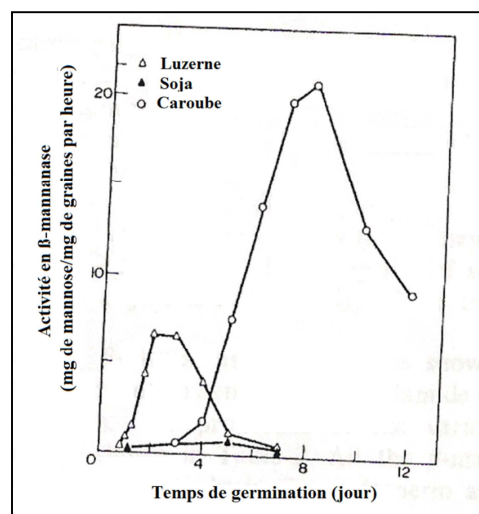


Figure 6. Evolution de l'activité  $\beta$ -mannanase au cours de la germination pour les graines de luzerne, de caroube et les radicules de soja (MCCLEARY *et al.*, 1975). Les ronds blancs illustrent la  $\beta$ -mannanase de caroube, les triangles blancs celle de luzerne et les triangles noirs celle de soja.

Les galactomannanes sont hydrolysés par les trois enzymes en mannose, en galactose, en manno-oligosaccharides et en galacto-manno-oligosaccharides (MCCLEARY *et al.*, 1974). Ceux-ci vont pouvoir être mobilisés lors de la germination et soutenir la radicule dans son développement (BEWLEY, 1997).

Les trois enzymes intervenant dans la dégradation des galactomannanes, leurs modes d'actions ainsi que les produits de l'hydrolyse seront détaillés à la section II.4.

Pour la graine de caroube en germination, MCCLEARY *et al.* (1974) ont étudié la diminution de la quantité de galactomannanes au cours de la germination et l'évolution des taux de monosaccharides, disaccharides et oligosaccharides (figure 7). Ces résultats reflètent les activités enzymatiques ayant cours durant la germination.

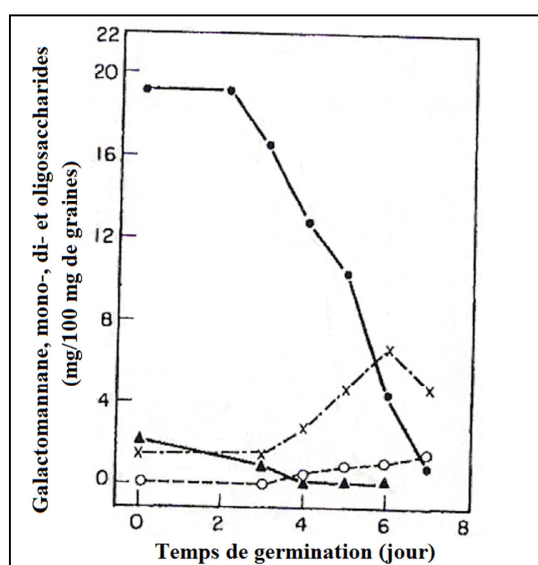


Figure 7. Evolution des taux de galactomannanes, de monosaccharides, de disaccharides et d'oligosaccharides en fonction du temps de germination de la graine de caroube (MCCLEARY *et al.*, 1974). Les ronds noirs représentent les galactomannanes, les ronds blancs les monosaccharides, les triangles les oligosaccharides et les croix les disaccharides.

En ce qui concerne la caroube, les cellules de l'endosperme conservent leur métabolisme lors de la germination et sécrètent les hydrolases. A l'inverse, pour le guar et le fenugrec, la source d'hydrolases est la couche à aleurone située à proximité de l'endosperme, dont les cellules ne sont plus actives (BEWLEY, 1997).

MCCLEARY (1976a) a démontré que le mannose et le galactose produits lors de l'hydrolyse des galactomannanes sont prélevés et métabolisés par l'embryon. Ils ne sont donc pas accumulés mais directement utilisés par la radicule (MCCLEARY *et al.*, 1975).

MCCLEARY (1976a) a comparé les quantités de mannose et de galactose théoriquement produites durant la germination par hydrolyse avec les taux réellement observés dans les graines (figure 8). Après plusieurs jours de germination, les quantités de mannose et de galactose restent faibles malgré l'hydrolyse. Ces observations corroborent l'hypothèse de l'utilisation des deux sucres simples par la radicule.

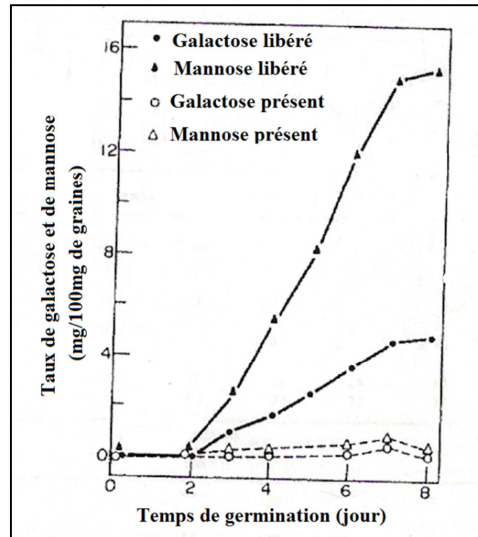


Figure 8. Evaluation des quantités de galactose et mannose produites par hydrolyse et des quantités réellement retrouvées dans les graines de caroube en germination (MCCLEARY *et al.*, 1976a). Les droites en traits pleins présentent les quantités calculées de mannose et de galactose relâchées par l'hydrolyse des galactomannanes. Les droites en pointillés représentent les quantités de galactose et de mannose retrouvées dans les graines.

## II.4 HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA GOMME DE CAROUBE

Les endohydrolases et les exohydrolases sont les deux types d'enzymes rencontrés pour le clivage des hémicelluloses. Les endohydrolases clivent les liaisons glycosidiques internes tandis que les exohydrolases clivent au niveau de la dernière liaison et libèrent des monosaccharides (MOREIRA *et al.*, 2008).

Trois enzymes dégradent les galactomannanes : une endohydrolase, la  $\beta$ -mannanase (endo- $\beta$ -1,4-mannanase, 1,4- $\beta$ -d-mannan mannohydrolase, EC 3.2.1.78) et deux exohydrolases, la  $\beta$ -mannosidase (1,4- $\beta$ -d-mannopyranoside hydrolase, EC 3.2.1.25) et l' $\alpha$ -galactosidase (1,6- $\alpha$ -d-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) (figure 9) (MCCLEARY *et al.*, 1974).

La structure des galactomannanes permet l'action synergique des différentes enzymes (MOREIRA *et al.*, 2008). L'action des trois enzymes est nécessaire à la conversion complète des galactomannanes en galactose et mannose (ADEMARK *et al.*, 1998).

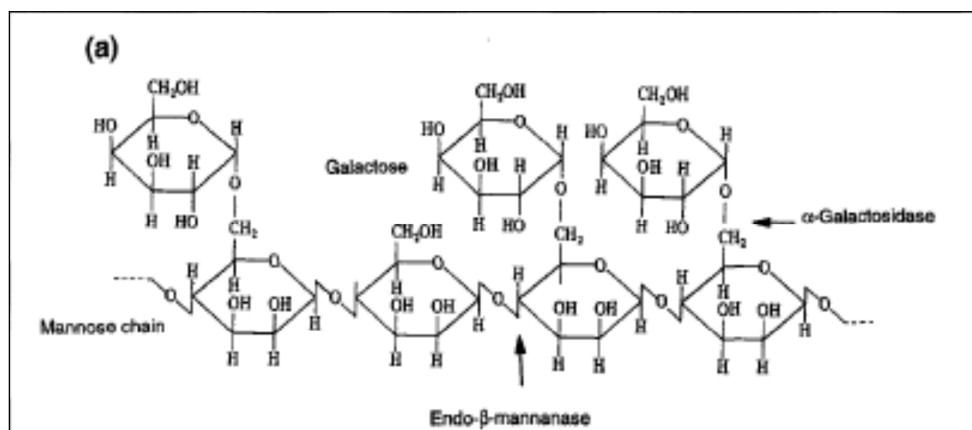


Figure 9. Illustration de l'action d'une  $\beta$ -mannanase et d'une  $\alpha$ -galactosidase sur un galactomannane (BEWLEY, 1997).

Des recherches consacrées aux enzymes dégradant les galactomannanes ont été menées par la purification et la caractérisation de l'enzyme et par l'analyse des produits d'hydrolyse. Ces techniques ont permis de mettre en évidence les modes d'actions des enzymes d'origine animale, végétale et microbienne (MCCLEARY *et al.*, 1983b ; MOREIRA *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'hydrolyse enzymatique peut être utilisée pour étudier la structure fine des polysaccharides. En utilisant une  $\beta$ -mannanase de mode d'action connu et en analysant les profils en oligosaccharides obtenus, on peut déduire des informations concernant la répartition des résidus galactoses. A partir de ces informations, on peut envisager un modèle illustrant la structure du galactomannane (MCCLEARY, 1978 ; DAAS *et al.*, 2000).

Dans cette section, les trois enzymes intervenant dans la dégradation des galactomannanes, leurs différentes origines et leurs modes d'action vont être abordés.

#### II.4.1 LES $\beta$ -MANNANASES

Les  $\beta$ -mannanases sont des endohydrolases. Elles clivent de manière aléatoire les liaisons  $\beta$ -1,4 internes de la chaîne principale de mannoses (DEKKER *et al.*, 1976 ; MCCLEARY, 1988). Elles produisent ainsi de nouvelles extrémités de chaînes. Le degré de substitution et la répartition des galactoses sur le squelette de mannoses influencent la dégradation des galactomannanes par les  $\beta$ -mannanases (MCCLEARY, 1988 ; ADEMARK *et al.*, 1998 ; MOREIRA *et al.*, 2008). Souvent, les galactomannanes hautement substitués sont résistants aux attaques hydrolytiques des  $\beta$ -mannanases (MCCLEARY, 1979).

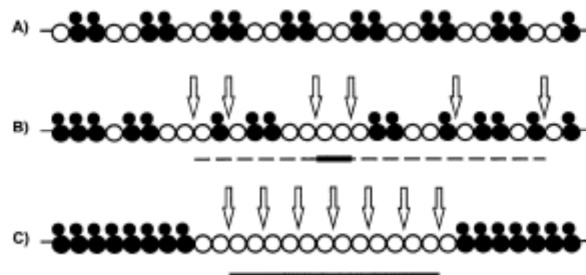
Les  $\beta$ -mannanases proviennent de différentes sources. Elles sont produites par des bactéries (*Bacillus subtilis*), par des champignons et des moisissures (*Aspergillus niger*), par les graines de plantes terrestres (*Ceratonia siliqua*, *Cyamopsis tetragonolobus*), par des plantes aquatiques et par certains invertébrés (DEKKER *et al.*, 1976 ; ZAKARIA *et al.*, 1998 ; XU *et al.*, 2002).

Suivant la provenance de la  $\beta$ -mannanase, son mode d'action varie.

Parmi les  $\beta$ -mannanases bactériennes, le mode d'action de la  $\beta$ -mannanase produite par *Bacillus subtilis* a été relativement bien étudié. Lors de l'hydrolyse de galactomannanes par la  $\beta$ -mannanase de *Bacillus subtilis*, les produits de dégradation obtenus sont du mannose, des manno-oligosaccharides de degré de polymérisation compris entre 2 et 8 et des galacto-manno-oligosaccharides (DEKKER *et al.*, 1976). Néanmoins, un haut degré de substitution du galactomannane par des galactoses limite l'activité d'hydrolyse de la  $\beta$ -mannanase de *Bacillus subtilis* (MCCLEARY, 1988).

Les  $\beta$ -mannanases fongiques quant à elles sont connues pour dégrader les mannanes et galactomannanes de manière aléatoire. Les produits d'hydrolyse sont principalement des manno-oligosaccharides de degré de polymérisation égal ou supérieur à 2 et des galacto-manno-oligosaccharides (DEKKER *et al.*, 1976).

Le mode d'action de la  $\beta$ -mannanase d'*Aspergillus niger* a été détaillé en fonction de la distribution des galactoses sur le squelette de mannoses (figure 10) (DAAS *et al.*, 2000). Elle ne présente pas de difficultés pour hydrolyser tant les répartitions aléatoires que les configurations en blocs uniformes. Toutefois, elle ne parvient pas à se fixer sur un galactomannane de répartition ordonnée (alternance de deux résidus substitués avec deux résidus non-substitués).



**Figure 10.** Mode d'action de la  $\beta$ -mannanase d'*Aspergillus niger* en fonction de la distribution des galactoses substitués de différents galactomannanes (DAAS *et al.*, 2000). (A) distribution ordonnée, (B) distribution aléatoire, (C) présence de zones non-substituées. Les cercles noirs représentent les mannoses substitués et les cercles blancs les mannoses non-substitués. Les petits cercles noirs illustrent les galactoses. La flèche blanche indique l'endroit où l'enzyme clive.

MCCLEARY (1988) s'est également intéressé à la  $\beta$ -mannanase d'*Aspergillus niger*. Il décrit un modèle d'hydrolyse selon lequel uniquement quatre résidus seraient nécessaires pour former le complexe avec le substrat. En se basant sur la figure 11, on observe les quatre résidus nécessaires à la réalisation de l'hydrolyse au point X. Si les résidus B ou D sont substitués par un galactose, le clivage de la chaîne de mannose est impossible. Par ailleurs, une substitution sur le résidu C n'affecte pas l'hydrolyse.

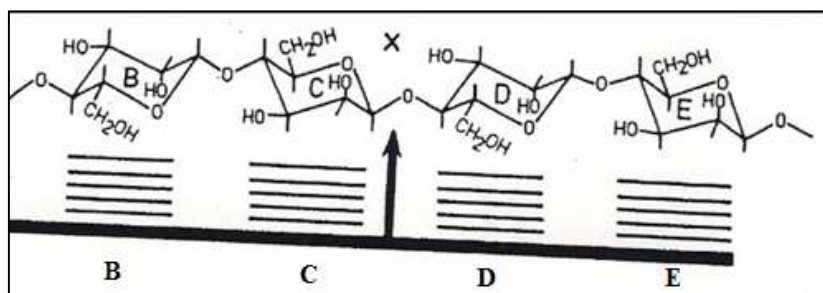


Figure 11. Mode d'action de la  $\beta$ -mannanase d'*Aspergillus niger* (MCCLEARY, 1988).

Pour ce qui est des  $\beta$ -mannanases d'origine végétale, MCCLEARY (1975) a mis en évidence quatre activités  $\beta$ -mannanases pour la luzerne et deux pour la caroube. Leurs modes d'action ne sont pas connus. Cependant, le mode d'action de la  $\beta$ -mannanase de guar a été examiné par MCCLEARY (1988). La figure 12 permet d'illustrer le modèle d'hydrolyse de la  $\beta$ -mannanase de guar. Pour réaliser l'hydrolyse au point X, la  $\beta$ -mannanase exige cinq résidus mannoses. Au niveau des résidus B et D, le complexe se forme par liaison à l'hydroxyméthyle du pyranose. Pour les résidus, A, C et E, la liaison se réalise avec l'hydroxyle. La substitution des résidus B, C ou D par un galactose empêche l'hydrolyse au point X (MCCLEARY, 1988).

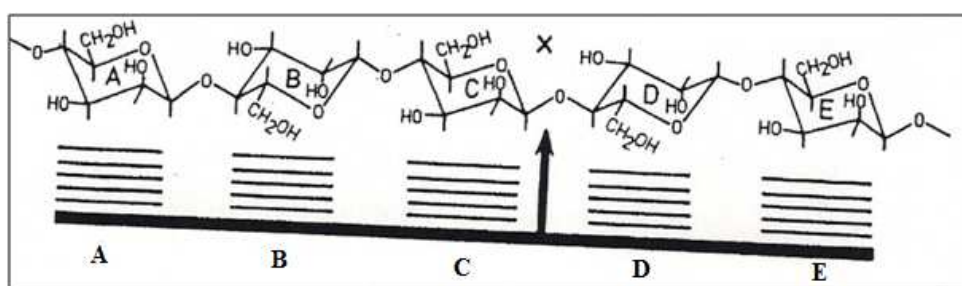


Figure 12. Mode d'action de la  $\beta$ -mannanase de guar (MCCLEARY, 1988).

Les  $\beta$ -mannanases ont de nombreuses applications industrielles. Elles sont employées dans l'industrie agro-alimentaire, le domaine pharmaceutique et la papeterie pour leur capacité d'hydrolyser des hémicelluloses et donc de permettre leur élimination (XU *et al.*, 2002).

#### II.4.2 LES $\beta$ -MANNOSIDASES

Les  $\beta$ -mannosidases sont des exohydrolases clivant des mannoses liés en  $\beta$ -1,4. Elles relâchent des résidus mannoses de l'extrémité non-réductrice des chaînes principales de mannoses (MOREIRA *et al.*, 2008). Elles sont capables d'hydrolyser du mannobiose et du mannotriose (MCCLEARY *et al.*, 1975).

Ces enzymes sont moins bien connues que les  $\beta$ -mannanases car elles sont difficiles à extraire et à purifier. En effet, les  $\beta$ -mannosidases sont instables et possèdent des problèmes de solubilité (MCCLEARY, 1982).



Les  $\beta$ -mannosidases peuvent provenir d'origine diverses : bactéries, moisissures, champignons, algues, invertébrés, vertébrés et graines en germination (GOMES *et al.*, 2007). Une activité  $\beta$ -mannosidase est détectée dans la plupart des graines en germination. Cependant, cette activité est très faible. On retrouve une activité  $\beta$ -mannosidase dans l'endosperme mais également dans les cotylédons et la radicule (MCCLEARY *et al.*, 1975).

Alors que la synthèse des  $\beta$ -mannanases et des  $\alpha$ -galactosidases est dépendante de la germination des graines de guar, les  $\beta$ -mannosidases ne paraissent pas liées au processus germinatif et semblent déjà présentes dans l'endosperme. Elles hydrolysent les manno-oligosaccharides principalement en mannose, mais également en mannobiose et mannotriose.

La  $\beta$ -mannosidase retrouvée dans les cotylédons est utile à la radicule pour produire du mannose en clivant le mannobiose et le mannotriose qu'il a absorbés (MCCLEARY, 1983a).

MCCLEARY (1982) a extrait et purifié une  $\beta$ -mannosidase à partir de graines de guar en germination. Il a pu mettre en évidence que le mannopentaose était le substrat privilégié de la  $\beta$ -mannosidase de guar. Effectivement, il est dégradé deux fois plus rapidement que le mannotetraose et cinq fois plus rapidement que le mannotriose.

En 1999, ADEMARK a également purifié une  $\beta$ -mannosidase d'*Aspergillus niger*. Cette  $\beta$ -mannosidase est capable d'hydrolyser des manno-oligosaccharides de degré de polymérisation allant de 2 à 6 mais également des galactomannanes afin de libérer des mannoses. L'hydrolyse de galacto-manno-oligosaccharides a mis en évidence que la  $\beta$ -mannosidase d'*Aspergillus niger* clivait au-dessus mais pas en-dessous de la chaîne latérale.

### **II.4.3 LES $\alpha$ -GALACTOSIDASES**

Les  $\alpha$ -galactosidases font partie des enzymes débranchantes. Elles catalysent l'hydrolyse des résidus galactoses substitués et liés à la chaîne principale par une liaison de type  $\alpha$ -1,6 (MOREIRA *et al.*, 2008).

Les  $\alpha$ -galactosidases proviennent de certains microorganismes (*Aspergillus sp.*), de diverses plantes (*Cyamopsis tetragonollobus*) et de quelques animaux (insectes) (DEY *et al.*, 1972).

MCCLEARY (1974) a établi que les graines de caroube en germination contiennent trois activités  $\alpha$ -galactosidases contre deux pour les graines de guar et de luzerne et quatre pour les radicules de soja. Une de ces activités pour chaque plante est située dans l'endosperme et semble être principalement impliquée dans l'hydrolyse des galactomannanes. Chez les graines de caroube, de guar et de luzerne, cette  $\alpha$ -galactosidase est responsable de la majeure partie de l'activité totale. Les autres activités  $\alpha$ -galactosidase seraient situées dans la radicule.

Les  $\alpha$ -galactosidases de graines de luzerne en germination enlèvent les galactoses substitués sur les chaînes de mannose de manière aléatoire (MCCLEARY, 1980). Elles sont capables d'enlever plus de 90% des résidus galactose d'une dizaine de galactomannanes naturels étudiés (MCCLEARY, 1979).

L'hydrolyse enzymatique de galactomannanes permet l'obtention de différents profils en oligosaccharides en fonction des enzymes utilisées, de leurs origines et des conditions expérimentales. Les oligosaccharides obtenus permettent de mettre en évidence le mode d'action d'une enzyme ou au contraire la structure fine du galactomannane mais ils pourraient également présenter certaines propriétés prébiotiques. Ce volet sera approfondi dans la section suivante.

## **II.5 LES (GALACTO)-MANNO-OLIGOSACCHARIDES**

### ***II.5.1 DESCRIPTION DES GALACTO-MANNO-OLIGOSACCHARIDES***

Selon la nomenclature IUB-IUPAC, les oligosaccharides sont des saccharides contenant 3 à 10 unités de sucres simples. D'autres classifications considèrent les saccharides contenant entre 3 et 19 unités comme oligosaccharides (MUSSATTO *et al.*, 2007).

Les galacto-manno-oligosaccharides (GMOS) sont des oligosaccharides constitués d'une chaîne de mannoses liés entre eux par des liaisons de type  $\beta$ -1,4 sur laquelle sont substitués des résidus galactose simple. Le galactose substitué est lié en O-6 à un mannose du squelette principal par une liaison de type  $\alpha$ -1,6 (DEKKER *et al.*, 1976).

Les manno-oligosaccharides (MOS) sont quant à eux des chaînes de mannoses liés entre eux par des liaisons de type  $\beta$ -1,4. En fonction du degré de polymérisation de l'oligosaccharide, on parle de mannobiose, de mannotriose, de mannotetraose, de mannopentaose, de mannohexaose, etc. (DEKKER *et al.*, 1976 ; MCCLEARY, 1982).

### ***II.5.2 PROPRIETES PREBIOTIQUES DES MANNO-OLIGOSACCHARIDES***

Différents auteurs confèrent aux manno-oligosaccharides des propriétés prébiotiques (ZAKARIA *et al.*, 1998 ; KURAKAKE *et al.*, 2006 ; MOURAO *et al.*, 2006 ; PINHEIRO *et al.*, 2009).

Les prébiotiques ont d'abord été définis comme étant des ingrédients alimentaires non-digestibles jouant un rôle bénéfique sur la santé de l'hôte par stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité d'un nombre limité de bactéries présentes dans le colon (VULEVIC *et al.*, 2004 ; WANG, 2009).

Par la suite, la définition a été remaniée et les prébiotiques sont définis comme étant des ingrédients sélectivement fermentables qui occasionnent des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité de la microflore gastro-intestinale. Ils confèrent à l'hôte des effets bénéfiques pour sa santé et son bien-être (RASTALL *et al.*, 2002 ; WANG, 2009).

Le prébiotique exerce un effet indirect car ce n'est pas lui mais le changement de la composition de la microflore intestinale qu'il a induit qui est responsable des effets positifs (WANG, 2009).

Pour classer un ingrédient alimentaire comme prébiotique, il existe 5 critères qui doivent être validés (WANG, 2009) :

- Il doit être résistant aux différents processus de digestion pour atteindre le colon
- Il doit pouvoir être fermenté par la microflore intestinale
- Il doit être bénéfique pour la santé de l'hôte
- Il doit stimuler de façon sélective les probiotiques
- Il doit rester stable durant les différents traitements alimentaires du process

Parmi les prébiotiques commercialisés, on retrouve l'inuline, les fructo-oligosaccharides, les galacto-oligosaccharides, les isomalto-oligosaccharides, les malto-oligosaccharides, les xylo-oligosaccharides (RASTALL *et al.*, 2002 ; VULEVIC *et al.*, 2004 ; MUSSATTO *et al.*, 2007).

Bien que moins souvent cités, les manno-oligosaccharides font l'objet de publications récentes concernant leur potentiel prébiotique (ZAKARIA *et al.*, 1998 ; KURAKAKE *et al.*, 2006 ; MOURAO *et al.*, 2006 ; PINHEIRO *et al.*, 2009).

Les MOS comme le mannobiose et le mannotriose jouent un rôle important dans la croissance sélective d'une microflore intestinale bénéfique pour l'humain (KURAKAKE *et al.*, 2006).

Ils sont notamment importants pour la croissance des Bifidobactéries qui exercent un effet positif sur les cellules constitutives de la muqueuse de l'intestin (ZAKARIA *et al.*, 1998). Ces bactéries auraient la particularité de stimuler le système immunitaire et de produire de la vitamine B. Ils joueraient également un rôle d'inhibiteurs de croissance des pathogènes et réduiraient l'ammoniac du sang ainsi que le taux de cholestérol (WANG, 2009).

Les manno-oligosaccharides, en augmentant la masse des fèces, sont également bénéfiques pour la microflore intestinale autre que les Bifidobactéries (ZAKARIA *et al.*, 1998).

MOURAO *et al.* (2006) et PINHEIRO *et al.* (2009) se sont intéressés aux lapins venant d'être sevrés qui présentaient souvent des problèmes digestifs. Ceux-ci sont affectés par l'instabilité de la microflore caecale qui se caractérise par des diarrhées, des pertes d'appétit et un taux de mortalité accru.

Ils ont étudié les effets des manno-oligosaccharides en tant que promoteur naturel de croissance chez ses jeunes lapins. Il a été mis en évidence que les MOS étaient aussi performants que les antibiotiques, ayant cette fonction. Après analyse du taux de mortalité, de la morphologie de l'intestin et de la concentration en acides gras volatils caecaux, il apparaît également que la santé des lapins est améliorée par l'action des MOS (MOURAO *et al.*, 2006). Ces constats sont intéressants car l'Union Européenne tente de réduire les quantités d'antibiotiques utilisées.

Les MOS semblent être capables de protéger l'intestin contre divers pathogènes telles que certaines bactéries GRAM négatives (PINHEIRO *et al.*, 2009). Ces bactéries entériques s'attachent à la paroi intestinale grâce à un fimbriae. Une fois fixées, elles colonisent l'intestin et déclenchent des maladies (MOURAO *et al.*, 2006). Un bon nombre d'entre elles possèdent un fimbriae de type 1 qui est spécifique au mannose et qui est donc capable de se fixer aux récepteurs mannose des cellules de l'intestin (FIRON *et al.*, 1984). Les MOS sont intéressants car ils sont compétitifs des récepteurs mannose des cellules intestinales. Ils vont se fixer sur les bactéries pathogènes et empêcher leur colonisation et le développement de maladies (MOURAO *et al.*, 2006).

Cependant, PINHEIRO *et al.* (2009) après avoir ajouté une certaine quantité de MOS dans les régimes de jeunes lapins sevrés n'ont pas observé d'effets positifs. La croissance et le taux de survie n'ont pas été améliorés. Les auteurs soulignent toutefois que, dans le cas d'un régime pauvre en fibres alimentaires, la diminution des performances de croissance observée peut être évitée par un apport de MOS.

Les manno-oligosaccharides pourraient également inhiber la fonction lymphocytaire. La stimulation de la réponse immune consommerait une quantité d'énergie importante au dépend de la croissance. Ce mécanisme permettrait aux jeunes animaux sevrés d'accroître leurs performances de croissance (MOURAO *et al.*, 2006).

La recherche scientifique a démontré les propriétés prébiotiques et l'intérêt de différents oligosaccharides non-fermentescibles issus de l'hydrolyse des hémicelluloses. Certains, devenus populaires, sont actuellement commercialisés.

A la lueur de ces observations, des recherches concernant l'obtention et les propriétés prébiotiques d'oligosaccharides tels que les manno-oligosaccharides et les galacto-manno-oligosaccharides constituent une voie judicieuse de travail. En effet, elles pourraient aboutir à la découverte d'effets prébiotiques innovants pouvant mener, à long terme, à des applications industrielles et commerciales.

### III OBJECTIFS

La découverte de prébiotiques constitue le contexte général de ce travail de fin d'études. La production d'oligosaccharides par hydrolyse enzymatique de la gomme de caroube sera plus particulièrement ciblée.

Différentes études ont été menées sur la purification des  $\beta$ -mannanases de diverses origines : végétale MCCLEARY (1975, 1976a, 1979a, 1983a), bactérienne et fongique (GUBITZ *et al.*, 1996 ; ADEMARK *et al.*, 1998 ; ZAKARIA *et al.*, 1998 ; XU *et al.*, 2002). D'autres travaux font référence à l'hydrolyse de la gomme de caroube par des  $\beta$ -mannanases microbiennes ou végétales telle que la luzerne (MCCLEARY, 1976b ; MCCLEARY, 1979b ; MCCLEARY, 1983a).

Toutefois, la littérature s'exprime peu sur l'hydrolyse de la gomme de caroube par des  $\beta$ -mannanases extraites des graines de caroube et sur la caractérisation des profils en oligosaccharides (MOS et GMOS) obtenus lesquels pourraient présenter des effets prébiotiques.

Dès lors, l'objectif de cette étude sera double et visera à :

- Purifier les  $\beta$ -mannanases de graines de caroube en germination dans le but d'approfondir les connaissances au sujet de leur mode d'action et de leur conservation.
- Valider une méthode AEC-PAD permettant l'analyse des manno-oligosaccharides et des galacto-manno-oligosaccharides issus de l'hydrolyse de la gomme de caroube par les  $\beta$ -mannanases.

## IV MATERIEL ET METHODES

Un tableau récapitulatif reprenant la provenance et la pureté des réactifs utilisés lors des manipulations est présenté en annexe 1.

### IV.1 CARACTERISATION DE LA GOMME DE CAROUBE BRUTE ET PURIFIEE

Plusieurs critères ont été envisagés pour définir la gomme de caroube brute et purifiée (extraite à température ambiante ou à 80°C). Il s'agit de la matière sèche, de la solubilité, des propriétés rhéologiques, de la composition en monosaccharides et de l'estimation du poids moléculaire.

#### IV.1.1 PURIFICATION DE LA GOMME DE CAROUBE

La gomme de caroube est purifiée par extraction à l'éthanol. Un schéma récapitulatif de la procédure de purification de la gomme de caroube brute est présenté à la figure 13.

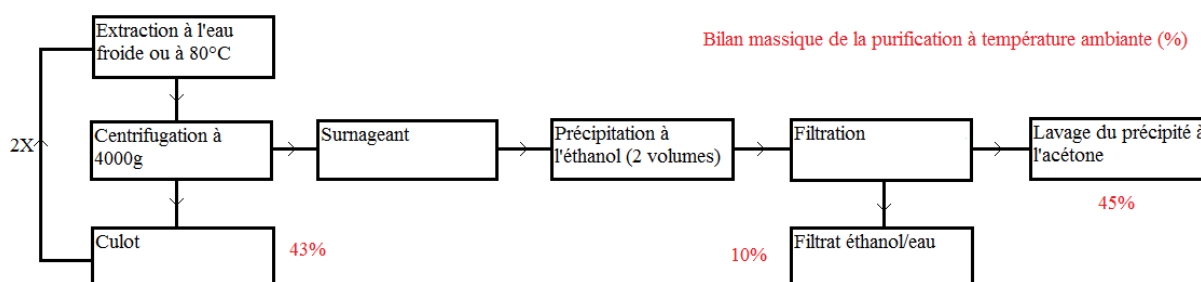


Figure 13. Schéma récapitulatif de la procédure de purification de la gomme de caroube brute.

Une solution de gomme de caroube brute (Actaris Food Belgium) 1% w/v est préparée dans l'eau distillée. Elle est mélangée sur plaque agitante pendant 30 minutes et homogénéisée à l'aide d'un Ultra-turrax. La gomme de caroube brute est mise en solution à température ambiante ou à 80°C.

La solution de gomme de caroube brute est ensuite centrifugée à une vitesse de 4000 g pendant 30 minutes à 20°C (centrifugeuse Beckman). Les culots contenant les matières insolubles subissent trois extractions successives. Ils sont récupérés et séchés à l'air libre.

Les galactomannanes solubles contenus dans les surnageants sont précipités à l'aide de deux volumes d'éthanol. Le précipité est filtré puis lavé à l'acétone, séché à l'air libre et broyé afin d'obtenir la gomme de caroube purifiée. Celle-ci est dite « extraite à température ambiante ou à 80°C et purifiée » en fonction de la température de mise en solution de la gomme brute.

Le culot et le surnageant après filtration sont conservés pour la réalisation d'un dosage des monosaccharides (section IV.1.2.3).

## **IV.1.2 PARAMETRES ETUDIES**

### **IV.1.2.1 MATIERES SECHES**

Une quantité d'échantillon est pesée de manière précise dans une conserve en verre tarée. Celle-ci est ensuite placée ouverte dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant (24h). A sa sortie de l'étuve, la conserve est placée dans un dessiccateur pendant 30 minutes. Elle est ensuite fermée et pesée.

La formule suivante permet de déterminer le pourcentage de matière sèche (%MS) :

$$\% MS = \frac{\text{Poids sec après étuve}}{\text{Poids humide avant étuve}} \times 100$$

Des matières sèches ont été réalisées, en trois répétitions, pour la gomme de caroube brute, pour les gommes de caroube purifiées extraites à température ambiante et à 80°C ainsi que lors de l'étude de solubilité (section IV.1.2.2).

### **IV.1.2.2 ETUDE DE LA SOLUBILITE**

L'étude de solubilité est menée sur des solutions de gomme 0,1 % w/v.

La solubilité est évaluée pour la gomme de caroube brute et pour les gommes de caroube purifiées extraites à température ambiante et à 80°C. Deux répétitions par mesure ont été envisagées.

Deux températures de solubilisation ont été étudiées : température ambiante (20°C) et 80°C. Suivant la température, quatre temps différents de mise en solution ont été envisagés. A température ambiante, les temps de solubilisation choisis sont 30, 60, 120 et 180 minutes. A 80°C, les temps testés sont 5, 10, 30 et 60 minutes (DAKIA *et al.*, 2008).

Pour mesurer le pourcentage de solubilité, l'échantillon de gomme est solubilisé à la température établie pendant le temps fixé. Après cet intervalle de temps, la solution est centrifugée à une vitesse de 4000 g pendant 15 minutes à 20°C (centrifugeuse Beckman) pour éliminer le matériel insoluble. Une matière sèche (section IV.1.2.1) est réalisée sur le surnageant et permet la détermination du pourcentage de solubilisation.

$$\% \text{ solubilité} = \frac{\text{concentration du surnageant } (\frac{mg}{ml})}{\text{concentration de la préparation initiale } (\frac{mg}{ml})} \times 100$$

#### IV.1.2.3 COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES

Les monosaccharides sont dosés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après hydrolyse et dérivatisation en leurs acétates d'alditols respectifs.

L'hydrolyse constitue la première étape du dosage et est réalisée sur 50 mg d'échantillon par ajout de 3 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. Elle se déroule pendant 3h dans une étuve à 100°C. La réaction est stoppée par refroidissement des tubes dans la glace et ajout de  $\text{NH}_4\text{OH}$  15 M jusqu'à obtention d'un pH neutre ou alcalin.

400  $\mu\text{l}$  de l'hydrolysate sont réduits en alditols par ajout de 2 ml de DMSO contenant 2% de  $\text{NaBH}_4$ . La réduction se déroule dans un bain marie à 40°C pendant 90 minutes. L'ajout de 0,6 ml d'acide acétique glacial permet la destruction de l'excès de  $\text{NaBH}_4$ .

L'acétylation est effectuée par ajout de 4 ml d'anhydride acétique pendant 15 minutes à température ambiante en présence de 0,4 ml de 1-méthylimidazole comme catalyseur. La réaction d'acétylation est arrêtée par addition de 10 ml d'eau distillée.

Après refroidissement, 3 ml de dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) sont additionnés et les acétates d'alditols correspondant à chaque monosaccharide sont séparés de la phase aqueuse. La phase inférieure est récupérée à la pipette pasteur afin d'être injectée en CPG. Deux répétitions ont été réalisées par échantillon.

Le 2-déoxy-D-glucose est utilisé comme standard interne. Un millilitre de solution de standard interne 1mg/ml est ajouté après l'hydrolyse. Les standards utilisés sont le L(+)-rhamnose, le D(-)-arabinose, le D(+)-xylose, le D(+)-mannose, le D(+)-glucose et le D(+)-galactose.

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard Agilent 6890 series équipé d'une colonne HP1 méthyl siloxane (30m x 0,32mm ; épaisseur du film 0,25  $\mu\text{m}$ ). Les échantillons sont injectés « on column ». L'hélium est utilisé comme gaz porteur. Le débit s'élève à 1,6ml/min. La température d'injection est de 290°C. Le programme thermique du four débute à une température initiale de 120°C maintenue durant une minute. La température augmente de manière linéaire jusqu'à 220°C et ensuite jusqu'à 290°C en 35 minutes. Enfin, elle se stabilise à cette température pendant 4 minutes. Les composés sont détectés par ionisation dans la flamme à 320°C.



Pour chaque standard de monosaccharide, un facteur de réponse est calculé par rapport au standard interne. Il permet la correction de la surface du pic de chaque monosaccharide car la sensibilité du détecteur est variable selon le composé à doser.

$$Fr = \frac{S_{mono} \times M_{si}}{S_{si} \times M_{mono}}$$

Avec Fr, le facteur de réponse ;  $S_{mono}$ , l'aire du pic du standard de monosaccharide ;  $S_{si}$ , l'aire du pic de standard interne ;  $M_{si}$ , la masse de standard interne (mg) ;  $M_{mono}$ , la masse du standard de monosaccharide (mg).

Le pourcentage en chaque monosaccharide est déterminé de la manière suivante :

$$\% \text{ monosaccharide} = \frac{M_{si} \times S_{mono}}{S_{si} \times Fr \times M_{éch}} \times 100$$

Avec  $M_{si}$ , la masse de standard interne (mg) ;  $S_{mono}$ , la surface du pic de monosaccharide dans l'échantillon ;  $S_{si}$ , la surface du pic de standard interne ; Fr, le facteur de réponse et  $M_{éch}$ , la masse d'échantillon injectée exprimée en matière sèche (mg).

#### IV.1.2.4 ETUDE RHEOLOGIQUE

Les propriétés rhéologiques d'écoulement et de viscoélasticité de la gomme de caroube brute et purifiée ont été caractérisées sur des solutions 1% w/v. La gomme de caroube a été mise en solution à température ambiante ou à 80°C pendant 30 minutes sous agitation mécanique.

Les mesures rhéologiques ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée Bohlin CVO 120 High Resolution (Bohlin Instruments) équipé d'un bain marie d'eau. Une sonde de type cône-plan (angle du cône 4° et diamètre 40 mm) a été employée et l'intervalle a été fixé à 150 µm. Les échantillons ont été analysés à une température de 25°C.

La viscosité apparente ( $\eta$ ) et la contrainte tangentielle ( $\tau$ ) sont exprimées comme une fonction du gradient de vitesse ( $D$ ) allant de 1 s<sup>-1</sup> à 300 s<sup>-1</sup>. 60 points sont enregistrés par essai sur une échelle logarithmique.

Pour mettre en évidence les caractéristiques viscoélastiques, le balayage de fréquence allant de 0,01 Hz à 10 Hz a été mené à une amplitude constante de 1 Pa. DAKIA *et al.* (2008) ont démontré qu'à cette amplitude la gamme de viscoélasticité est linéaire. Les variations du module d'élasticité ( $G'$ ), du module de viscosité ( $G''$ ) sont des fonctions de la fréquence.

## IV.2 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE $\beta$ -MANNANASE

### IV.2.1 MESURE COLORIMETRIQUE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'activité enzymatique  $\beta$ -mannanase est mesurée à l'aide d'un kit de dosage Beta Mannazyme Tablets (Megazyme).

Le substrat, fourni sous forme de tablettes prêtes à l'emploi, est constitué de galactomannanes de caroube sur lesquels sont greffés de l'azurine. En cas d'hydrolyse par une  $\beta$ -mannanase, des fragments teintés et solubles en milieu aqueux sont libérés. Le relâchement de ceux-ci est mis en évidence par une augmentation de l'absorbance à 590 nm et peut être directement relié à l'activité enzymatique.

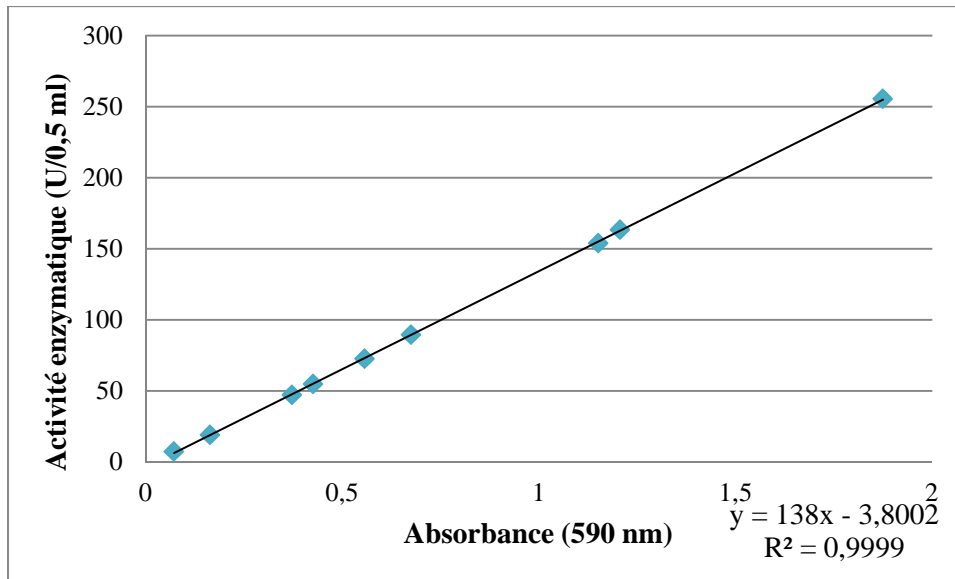
0,5 ml d'extrait enzymatique placé dans un tube en verre sont nécessaires pour la mise en œuvre du test enzymatique colorimétrique. Le tube est placé pendant 5 minutes dans un bain marie à 40°C. La réaction est initiée par l'ajout d'une tablette Beta-Mannazyme. Après 10 minutes, elle est stoppée par addition de 10 ml de solution Trizma Base (2% w/v, pH 8,5). Le tube est ensuite vigoureusement agité et laissé à température ambiante pendant 5 minutes pour le développement de la coloration. Il est mélangé une nouvelle fois avant d'être filtré (Whatman n°1).

Un blanc est préparé par ajout d'une tablette Beta-Mannazyme à 0,5 ml de tampon acétate pH 4,6. Le protocole appliqué est identique à celui des échantillons. Le blanc est utilisé comme zéro au spectrophotomètre.

L'absorbance des filtrats est mesurée avec un spectrophotomètre UV/visible Pharmacia Biotech Ultrospec 4000 à une longueur d'onde de 590 nm. Si l'absorbance atteinte est supérieur à 1,4, une dilution est nécessaire.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité nécessaire pour relâcher une nanomole de sucres réducteurs mesurés en équivalents mannose par minute sous les conditions définies du dosage.

La droite d'étalonnage de l'activité enzymatique endo- $\beta$ -mannanase a été établie à l'aide d'une endo- $\beta$ -mannanase commerciale produite par *Aspergillus niger* provenant de la firme Megazyme (figure 14). L'activité enzymatique endo- $\beta$ -mannanase à pH 4,6 et à 40°C est exprimée en fonction de l'absorbance à 590 nm.



**Figure 14. Droite d'étalonnage de l'activité  $\beta$ -mannanase à pH 4,6 et à 40°C.**

L'activité endo- $\beta$ -mannanase par ml de l'extrait enzymatique est calculée en tenant compte de toutes les dilutions :

$$\text{Activité } \beta\text{-mannanase par ml (U/ml)} = Y \times 2 \times D$$

Dans laquelle,

- Y représente l'activité enzymatique exprimée en Unités par dosage (0,5 ml)
- 2 convertit l'activité endo- $\beta$ -mannanase par 0,5 ml en activité endo- $\beta$ -mannanase par ml
- D représente le facteur de dilution supplémentaire de l'extrait enzymatique original

#### ***IV.2.2 MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR MESURE DE VISCOSITE***

Les mesures de viscosité sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée Bohlin CVO 120 High Resolution (Bohlin Instruments) équipé d'un bain marie d'eau. Un système à cylindres coaxiaux (diamètre 25 mm) a été employé et l'intervalle a été fixé à 150  $\mu$ m. Les échantillons ont été analysés à une température de 30°C.

#### **IV.2.2.1 PRÉPARATION DES BLANCS**

Le premier blanc, utilisé lors des mesures réalisées pour les radicules, les cotylédons et les enzymes commerciales, correspond à une solution de gomme de caroube 2% préparée dans le tampon acétate pH 4,6.

Le deuxième blanc nommé blanc endospermes est préparé à l'aide de 7,5 g d'endospermes décongelés placés dans 30 ml de tampon acétate pH 4,6. Ces endospermes sont désactivés par chauffage à 100°C et filtrés sur nylon.

#### **IV.2.2.2 PRÉPARATION DES TEMOINS**

Quatre solutions témoins sont préparées à l'aide d'enzymes commerciales.

Pour 100 ml de gomme de caroube 2% préparée dans le tampon acétate pH 4,6, les quantités suivantes d'enzymes sont ajoutées :

- 2 µl de  $\beta$ -mannanase (Megazyme, 285 U/ml)
- 50 µl de  $\beta$ -mannosidase (Megazyme, 100 U/ml)
- 10 µl de  $\alpha$ -galactosidase (Megazyme, 500 U/ml)
- 50 µl de  $\beta$ -mannosidase + 10 µl de galactosidase

Les enzymes sont ajoutées juste avant le mélange à l'Ultra-turrax.

#### **IV.2.2.3 PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE GERMES, DE COTYLÉDONS ET D'ENDOSPERMES**

14 cotylédons ou radicules sont nécessaires à la préparation d'une solution. Ce nombre correspond à la quantité de radicules ou de cotylédons que l'on retrouve pour 5 g d'endospermes. Les radicules ou les cotylédons sont broyés à l'Ultra-turrax dans 30 ml de solution de caroube 2% (tampon acétate pH 4,6) et filtrés sur tamis métallique afin d'éliminer les plus grosses particules susceptibles de perturber les mesures de viscosité.

En ce qui concerne les endospermes, la solution est préparée par broyage de 7,5 g d'endospermes pelés dans 30 ml de tampon acétate pH 4,6 et filtration sur tamis métallique.

La détermination des paramètres des mesures et les résultats seront présentés dans les sections V.3 et V.4.

## IV.3 EXTRACTION ET PURIFICATION DES $\beta$ -MANNANASES DE GRAINES DE CAROUBE EN GERMINATION

### IV.3.1 GERMINATION DES GRAINES DE CAROUBE

Le protocole de mise en germination est basé sur les travaux de MCCLEARY (1974).

Les graines de caroube subissent un traitement acide à l'aide d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 M pendant une heure sous agitation mécanique. Elles sont ensuite nettoyées abondamment avant d'être trempées dans de l'eau distillée pendant 24 h.

Les graines préalablement traitées sont mises en germination dans du papier essuie-tout humidifié à l'aide d'eau distillée (figure 15). Cette étape correspond au premier jour de germination. Les graines de caroube se développent à l'abri de la lumière et à température ambiante. Le papier essuie-tout est maintenu humide par des arrosages réguliers à l'aide d'une pissette d'eau distillée.



Figure 15. Illustration de la mise en germination des graines de caroube.

Les premières racicules émergent peu après le début de la mise en germination. Du sixième jour au neuvième jour de germination, les graines sont récoltées. Les endospermes sont séparés des racicules et des cotylédons. Les différentes parties récoltées (figure 15) sont congelées.

### IV.3.2 EXTRACTION DES $\beta$ -MANNANASES

Un protocole d'extraction des  $\beta$ -mannanases des endospermes germés de caroube a été établi sur base des travaux réalisés par MCCLEARY (1983a) concernant les  $\beta$ -mannanases de guar.

Les  $\beta$ -mannanases sont extraites à partir de 25 g d'endospermes de graines de caroube germées (section IV.3.1). Les endospermes sont décongelés à l'air libre avant le début de l'étape d'extraction.

Les endospermes sont placés dans un tampon acétate pH 4,6 (150 ml pour 25 g d'endospermes) et broyés dans celui-ci à l'aide d'un Ultra-turrax.

L'extraction est réalisée sous agitation à 30°C (MCCLEARY, 1975) pendant 5h en présence d'une très faible quantité d'azide de sodium (section V.2.2.1).

Après cette étape, l'extrait brut est homogénéisé et filtré sur nylon (porosité 100  $\mu$ m) afin d'éliminer les plus grosses particules. Le filtrat est récupéré et centrifugé à 10000 g pendant 20 minutes à température ambiante à l'aide d'une centrifugeuse Beckman.

A l'issue de la centrifugation, un jus dilué contenant les  $\beta$ -mannanases est obtenu. Un dosage colorimétrique de l'activité  $\beta$ -mannanase est réalisé sur cette fraction (section IV.2.1)

### IV.3.3 CONCENTRATION ET PURIFICATION DES $\beta$ -MANNANASES

Un protocole de concentration et de purification des  $\beta$ -mannanases contenues dans le jus d'extraction (section IV.3.2) a été établi sur base des travaux réalisés par MCCLEARY (1975, 1983a) concernant les  $\beta$ -mannanases de luzerne, de caroube et de guar mais également en s'appuyant sur des recherches se rapportant à la purification de  $\beta$ -mannanases d'origine microbienne (ADEMARK *et al.*, 1998 ; XU *et al.*, 2002 ; FERREIRA *et al.*, 2004).

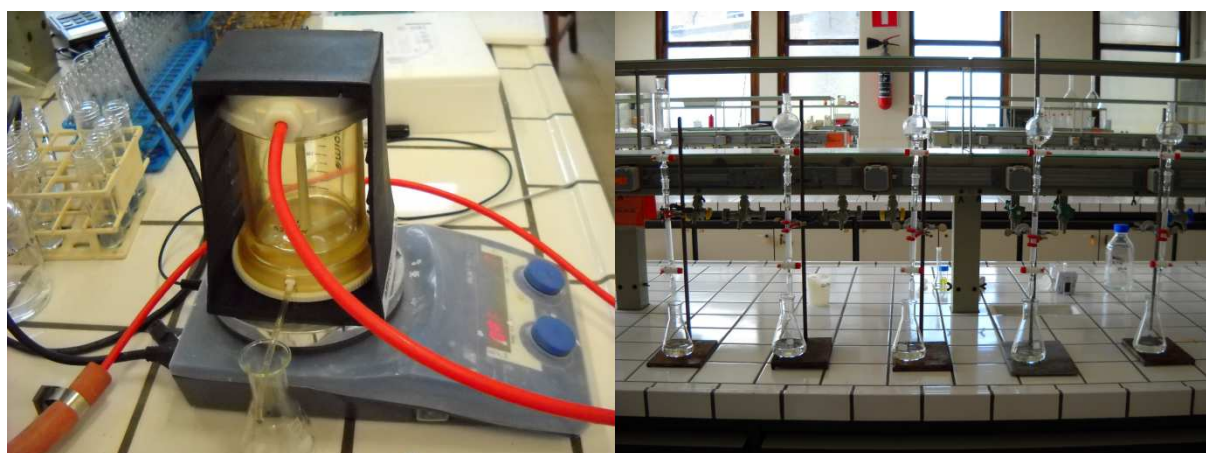


Figure 16. Dispositifs d'ultrafiltration et de filtration sur gel.

Les étapes de concentration sont menées à l'aide d'une unité d'ultrafiltration Amicon 8400 (pression maximale 75 psi) munie d'une membrane millipore (porosité 5000 Da, diamètre 76 mm) (figure 16). MCCLEARY (1975) a estimé le poids moléculaire des  $\beta$ -mannanases de caroube à 22000 Da. La porosité de la membrane d'ultrafiltration est adaptée pour la concentration des  $\beta$ -mannanases.

Après utilisation, la membrane d'ultrafiltration est reconditionnée par trempage dans une solution 100 ppm NaOCl (25°C) pendant trente minutes et rincée abondamment à l'eau distillée avant d'être conditionnée au frigo dans de l'éthanol/eau 10%.

Des tests enzymatiques colorimétriques sont réalisés sur le rétentat contenant les  $\beta$ -mannanases mais également sur le filtrat (section IV.2.1).

Pour la purification des  $\beta$ -mannanases, une étape de filtration sur gel est envisagée à l'aide d'une résine Sephadex G-100 (GE Healthcare). La gamme de séparation d'une résine G-100 s'étend de 4000 à 150 000 Da. Un tampon acétate pH 4,6 est employé comme éluant.

La chromatographie d'exclusion moléculaire est réalisée à l'aide de colonnes (tailles) en verre de porosité 1 (figure 16). Pour 1 g de Sephadex G-100, 17 ml de tampon acétate pH 4,6 sont ajoutés. La résine est laissée au repos pendant 6h avant d'être coulée dans les colonnes à raison de 10 ml par colonne. 10 colonnes de filtration sur gel sont nécessaires à la purification de l'extrait enzymatique secondaire (20 ml). 100 ml de tampon acétate pH 4,6 sont passés sur la colonne pour la conditionner. 2 ml d'extrait enzymatique sont placés en tête de chacune des dix colonnes à l'aide d'une pipette pasteur. La colonne est ensuite éluee à l'aide de tampon acétate pH 4,6. 15 fractions de 1 ml sont collectées dans des tubes à essai. Le débit d'élution est dépendant de la viscosité de la solution mais ne dépasse jamais 0,5 ml/min.

Afin de repérer les tubes contenant l'activité enzymatique  $\beta$ -mannanase, des tests enzymatiques colorimétriques (section IV.2.1) sont réalisés sur les tubes 4, 7 et 9. Si la tendance des essais préliminaires est respectée, les tubes 4 et 9 ne présentent pas d'activité enzymatique à l'inverse du tube 7.

Les performances de chaque étape et les caractéristiques des extraits enzymatiques sont présentées à la section V.2.1.

#### IV.3.4 ETUDE DE LA STABILITE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'étude de la stabilité de l'activité enzymatique des  $\beta$ -mannanases est orientée sur la conservation des extraits enzymatiques.

##### IV.3.4.1 CONSERVATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

L'étude de la stabilité des extraits enzymatiques s'est intéressée au contenant (flacons en verre ou en polypropylène), au mode de stockage (réfrigérateur et congélateur) et à l'impact de l'ajout d'azide de sodium et de sérum d'albumine bovine (BSA) (Sigma-Aldrich) à raison 0,5 mg/ml.

Afin de tester ces différentes hypothèses, un extrait enzymatique ultrafiltré d'activité enzymatique connue a été séparé en plusieurs fractions soumises à différents modes de conservation (tableau 4). A intervalles définis (0, 18, 36, 84, 156 heures), des prélèvements ont été effectués dans chacune des fractions et des tests enzymatiques réalisés dans le but de suivre l'évolution de l'activité  $\beta$ -mannanase au cours du temps.

**Tableau 4. Conditions de conservation testées pour l'étude de stabilité enzymatique.**

|                         |       | Mode de conservation  |                       |
|-------------------------|-------|-----------------------|-----------------------|
|                         |       | Réfrigérateur         | Congélateur           |
| Mode de conditionnement | Verre | Sans ajout            |                       |
|                         | PP    | Azide de sodium       | Azide de sodium       |
|                         |       | Azide de sodium + BSA | Azide de sodium + BSA |
|                         |       | Sans ajout            |                       |

##### IV.3.4.2 DEPISTAGE DE L'ACTIVITE PROTEASE

En parallèle de l'étude de conservation des extraits enzymatiques, un dépistage d'activité protéase a été envisagé.

Un milieu de culture permettant la détermination des activités enzymatiques protéolytiques est préparé. Pour 900 ml, 13,5 g d'agar sont pesés et ajoutés à 600 ml d'eau distillée. La poudre de lait est prévue séparément à raison de 10,5 g dans 350 ml d'eau distillée. Les deux flacons sont stérilisés pendant 20 minutes à 120°C. La préparation séparée des solutions permet d'éviter des problèmes de floculation lors de l'autoclavage. Après stérilisation, 300 ml de la solution de lait sont ajoutés à la solution d'agar.



Pour la réalisation du test protéase, des carrés de filtre papier (Whatman n°1, 50 x 50 mm) sont trempés dans les différentes solutions enzymatiques et déposés sur le milieu de culture. La présence de protéases est recherchée dans des extraits de  $\beta$ -mannanases bruts et contenant de l'azide de sodium. Une solution 1 mg/ml de papaïne (Fluka ; 3,08 U/mg) est utilisée comme témoin positif. Les blancs sont réalisés avec de l'eau distillée.

Après 24h dans une étuve à 30°C, les boîtes de Pétri sont contrôlées. Le test est considéré positif lorsqu'un halo transparent apparaît autour du papier filtre. Une auréole translucide indique l'existence d'une activité protéase dans l'extrait enzymatique.

A la fin de ces expériences, une technique de conservation optimale sera choisie en vue de préserver l'activité enzymatique des différents extraits.

#### **IV.4 MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE DES (GALACTO)-MANNO-OLIGOSACCHARIDES PAR AEC-PAD**

Une méthode originale de chromatographie d'échange anionique couplée à une détection ampérométrique pulsée (AEC-PAD) a été établie pour l'analyse des (galacto)-manno-oligosaccharides.

##### **IV.4.1 STANDARDS**

Neuf standards ont été utilisés lors de la validation de méthode. Les standards sont préparés dans de l'eau ultrapure. Le mannose (M) et le galactose (G) proviennent de Sigma-Aldrich. Le  $\beta$ -1,4-D-mannobiose (Man2), le  $\beta$ -1,4-D-mannotriose (Man3), le  $\beta$ -1,4-D-mannotetraose (Man4), le  $\beta$ -1,4-D-mannopentaose (Man5), le  $\beta$ -1,4-D-mannohexaose (Man6), le  $\alpha$ -1,6-D-galactosyl-mannobiose (Gal1Man2) et le di- $\alpha$ -1,6-D-galactosyl-mannopentaose (Gal2Man5) ont été obtenus auprès de la firme Megazyme. La pureté des standards a été estimée par AEC-PAD.

##### **IV.4.2 APPAREILLAGE ET CONDITIONS AEC-PAD**

Un système ICS-3000 (Dionex) est employé lors de expérimentations.

La séparation chromatographique des pics est réalisée à l'aide d'une colonne analytique CarboPac PA100 (250 mm x 4 mm, Dionex) et d'une colonne de garde CarboPac PA10 (40 mm x 4 mm, Dionex). Le débit est fixé à 1 ml par minute. La température des colonnes s'élève à 30°C. Le volume d'injection est de 25  $\mu$ l.

Les solvants d'élution sont préparés à l'aide de NaOH 50% de qualité réactif garantie, d'acétate de sodium trihydraté pour analyse et d'eau ultrapure. Le solvant A consiste en une solution de NaOH 100 mM. Quant au solvant B, il s'agit d'une solution d'acétate de sodium trihydraté 600 mM et de 100 mM de NaOH. Les solvants C et D correspondent respectivement à 500 mM de NaOH et à de l'eau ultrapure. Les solvants sont dégazés en continu par de l'hélium.

Le gradient d'élution ayant permis la séparation des neuf standards est présenté à la section V.5.

Les sucres sont détectés par ampérométrie pulsée sans dérivation au niveau de l'électrode en or. Les potentiels appliqués à l'électrode sont : E1 = 0,1 V (400 ms, intégration de 200 à 400 ms), E2 = -2 V (20 ms), E3 = 0,6 V (10 ms) et E4 = -0,1 V (60 ms).

Un logiciel Chromeleon 6.80 permet la mise en place et l'acquisition des données.

#### **IV.4.3 DESCRIPTION DES CRITERES DE VALIDATION**

Sept critères de validation ont été envisagés : la linéarité, la limite de détection, la limite de quantification, la répétabilité et la reproductibilité de l'injection, la justesse et la résolution des pics.

##### **IV.4.3.1 DROITE D'ETALONNAGE ET LINEARITE**

La droite d'étalonnage pour chaque standard est construite par régression linéaire au sens des moindres carrés. Six concentrations s'étalant sur une gamme allant de 0,01 mg/ml à 0,1 mg/ml. Trois répétitions par concentration sont effectuées. Le coefficient de détermination  $R^2$  permet l'évaluation de la linéarité des droites d'étalonnage. Il doit être supérieur à 0,989 pour être validé (GOFFIN *et al.*, 2009).

##### **IV.4.3.2 LIMITE DE DETECTION**

La limite de détection (LOD) est déterminée par l'analyse de dilutions successives d'une solution mix des 9 standards. La LOD est la concentration pour chaque standard pour laquelle le rapport signal/bruit égal à 3 est respecté (GOFFIN *et al.*, 2009).

##### **IV.4.3.3 LIMITE DE QUANTIFICATION**

La limite de quantification (LOQ) est recherchée par dilutions successives d'une solution mix des 9 standards. Elle correspond à une concentration pour chaque standard qui produit un rapport signal/bruit équivalent à 10 (GOFFIN *et al.*, 2009).

#### IV.4.3.4 REPETABILITE DE L'INJECTION

La répétabilité de l'injection pour chaque standard est évaluée par cinq injections successives d'une même solution de standards de concentration 0,1 mg/ml.

Les coefficients de variation sont acceptables s'ils sont inférieurs à 6%. Ce coefficient limite est fixé en fonction de la gamme de concentration (GODIN, 2008).

#### IV.4.3.5 REPRODUCTIBILITE DE L'INJECTION

La reproductibilité de l'injection pour chaque standard est déterminée par cinq injections d'une même solution de standards de concentration 0,1 mg/ml. Les injections sont réalisées pendant cinq jours différents.

Pour la gamme de concentration étudiée, les coefficients de variation doivent être inférieurs à 12% pour que la méthode soit reproductible (GODIN, 2008).

#### IV.4.3.6 JUSTESSE

La justesse de la méthode correspond au biais exprimé en pourcentage entre la valeur théorique et la valeur mesurée (HEUSKIN *et al.*, 2008). Le biais est calculé pour chaque standard à une concentration de 0,1 mg/ml.

La justesse est satisfaisante si les biais sont compris entre 90 et 110% (GODIN., 2008).

#### IV.4.3.7 RESOLUTION DES PICS

Plusieurs standards ont des temps de rétention proches, un facteur de résolution (R) rend compte de la séparation des pics. Il est calculé selon l'équation suivante :

$$R = 1,18 \times \frac{(t_{r(A)} - t_{r(B)})}{(\delta_A + \delta_B)}$$

Avec R, le coefficient de résolution ;  $t_r$ , les temps de rétention et  $\delta$ , les largeurs des pics à mi-hauteur.

Des facteurs de résolution sont calculés pour le mannose et le galactose (pics 1 et 2) et le mannohexaose et le di-galactosyl-mannopentaose (pics 8 et 9) aux deux concentrations extrêmes de la gamme : 0,01 et 0,1 mg/ml.

## **IV.5 ANALYSE ENZYMATIQUE**

### ***IV.5.1 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES D'HYDROLYSE***

La stabilité de l'activité  $\beta$ -mannanase en fonction de la température et du pH a été étudiée afin de déterminer les paramètres optimaux à sélectionner pour les tests d'hydrolyse.

Pour l'étude de l'activité enzymatique en fonction de la température, les tests enzymatiques colorimétriques (section IV.2.1) ont été réalisés dans des bains de température diverses : 0°C (glace), 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C et 100°C.

En ce qui concerne la stabilité par rapport au pH, un extrait enzymatique (pH 4,6 ; 40 ml) a été séparé en plusieurs fractions de 4 ml. Chacune d'entre elles subit une variation de pH par ajout de NaOH (0,1 M ; 1M) ou de HCl (0,1 M, 1 M). Des tests enzymatiques colorimétriques (section IV.2.1) sont effectués sur les fractions enzymatiques dont le pH s'étend sur une gamme allant de 2 à 11.

### ***IV.5.2 TESTS D'HYDROLYSE***

Le substrat utilisé lors des différents tests d'hydrolyse est de la gomme de caroube 0,1 % w/v purifiée à température ambiante et séchée à l'air libre. Le volume de substrat utilisé par hydrolyse s'élève à 50 ml. Les solutions de gomme de caroube purifiée sont préparées dans du tampon acétate pH 4,6.

Deux tests d'hydrolyse ont été menés à partir d'extraits enzymatiques. Le premier essai a employé 10 ml d'extrait enzymatique secondaire (58 U/ml) issu de la première ultrafiltration. L'autre a été réalisé à l'aide de 10 ml d'extrait enzymatique final (49 U/ml) provenant de la filtration sur gel et de la deuxième ultrafiltration (section V.2).

Les différentes hydrolyses sont menées, sous agitation mécanique, à pH 4,6 et à 40°C sur base des tests de stabilité enzymatique relatifs à l'optimisation des paramètres.

Des prélèvements de 2 ml sont réalisés durant les cinq premières heures et un dernier prélèvement est effectué après 24h d'hydrolyse. Les différents prélèvements sont chauffés à 100°C dans un bain marie afin d'inactiver les enzymes. Ils sont ensuite filtrés sur membrane nylon 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés en AEC-PAD pour la détermination de leur composition en oligosaccharides.

## V RESULTATS ET DISCUSSIONS

Afin de répondre aux deux objectifs de ce mémoire, quatre volets ont été développés :

- La caractérisation du substrat d'hydrolyse (section V.1).
- La mise en œuvre d'un protocole de concentration et de purification des  $\beta$ -mannanases extraites de graines de caroube en germination. Une étude de stabilité des  $\beta$ -mannanases au cours du temps a également été envisagée (section V.2). Pour rappel, les  $\beta$ -mannanases sont des endohydrolases clivant les liaisons internes  $\beta$ -1,4 de la chaîne principale de mannoses (MCCLEARY, 1988). Parmi les enzymes décrites (section II.4), elles sont les seules capables de donner des oligosaccharides. C'est pourquoi ce travail se focalisera sur leur étude et leur purification.
- La mise au point d'une méthode d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la viscosité (sections V.3 et V.4).
- La mise au point et la validation d'une méthode d'analyse des galacto-manno-oligosaccharides par AEC-PAD (section V.5) et l'analyse des hydrolysats de gomme de caroube purifiée (section V.6).

### V.1 CARACTERISATION DE LA GOMME BRUTE ET DE LA GOMME PURIFIEE

Cette section est consacrée à la caractérisation de la matière première d'hydrolyse. Elle permettra de mettre en évidence, à travers les propriétés de solubilité, la composition en monosaccharides et les propriétés rhéologiques, les facteurs susceptibles d'influencer l'hydrolyse enzymatique et le profil chromatographique qui en découle.

Il est intéressant de travailler avec de la gomme de caroube purifiée car quelle que soit l'origine géographique de la gomme de caroube, la purification permet d'obtenir un produit plus standardisé. Elle élimine également une majorité de composés insolubles et diminue ainsi d'éventuelles interférences à une bonne hydrolyse. Le produit purifié devrait présenter une solubilité accrue bénéfique au travail des enzymes.

En outre, l'influence de la température sur les différentes propriétés étudiées a également été envisagée.

Les gommes ont été purifiées comme indiqué à la section IV.1.

### V.1.1 MATIERES SECHES

Les pourcentages de matière sèche (section IV.1.2.1) obtenus pour la gomme de caroube brute et pour les gommes purifiées issues des extractions à température ambiante ou à 80°C sont présentés dans le tableau 5. Ils seront utilisés dans la détermination de la composition en monosaccharides.

**Tableau 5. Pourcentage de matière sèche pour les gommes brutes et purifiées.**

|      | Gomme brute | Gomme purifiée extraite à température ambiante | Gomme purifiée extraite à 80°C |
|------|-------------|--|--------------------------------|
| % MS | 93,2 ± 0,2  | 92,8 ± 0,2                                     | 89,5 ± 0,2                     |

### V.1.2 ETUDE DE LA SOLUBILITE

L'étude de solubilité est présentée sous forme d'une cinétique exprimant le pourcentage de solubilité en fonction du temps de solubilisation, pour les deux températures testées (température ambiante et 80°C) et pour les trois types de gommes (gomme brute et gommes purifiées extraites à température ambiante ou à 80°C) (section IV.1.2.2) (figure 17 et 18).

Ces graphiques mettent en évidence qu'aux deux températures de dissolution, plus le temps de solubilisation est grand, plus la mise en solution est efficace.

Pour les trois types de gomme de caroube, la solubilisation est plus performante à 80°C. Cette observation est confirmée dans la littérature (POLLARD *et al.*, 2007 ; MOREIRA *et al.*, 2008). En raison de son ratio mannose/galactose élevé (4 : 1), la gomme de caroube doit être chauffée pour être totalement soluble (section II.2.3). Cette différence est nettement moins marquée pour la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante qui présente des propriétés relativement similaires à température ambiante et à 80°C.

Les pourcentages de solubilité obtenus lors des expérimentations sont en-deçà des valeurs retrouvées dans la littérature. POLLARD *et al.*, 2007 annoncent des pourcentages de solubilisation de l'ordre de 50% à 5°C et de 90% à 85°C.

Pour la gomme de caroube brute, une quantité de composés insolubles supérieure à la moyenne pourrait expliquer ces résultats.

En ce qui concerne les gommes purifiées, un problème de granulométrie pourrait être à l'origine de ces résultats inférieurs. En effet, le broyage du précipité de purification séché à l'air libre ne permet pas l'obtention d'une poudre fine mais bien de particules plus grossières. Ce phénomène augmente les difficultés de mise en solution.

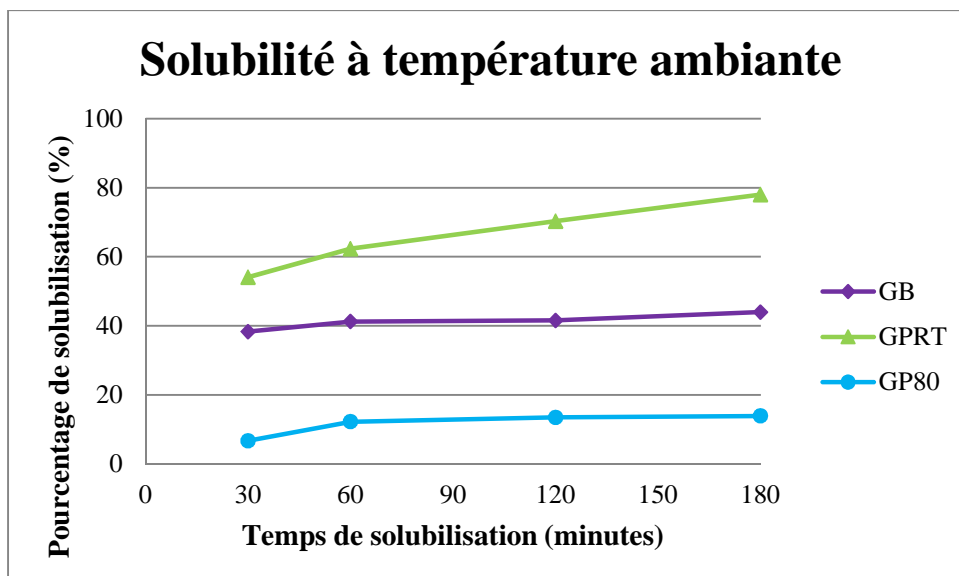


Figure 17. Cinétique de solubilité dans l'eau à température ambiante des gomme de caroube brute et purifiées (GB = gomme de caroube brute, GPRT = gomme de caroube purifiée à température ambiante, GP80 = gomme de caroube purifiée à 80°C).

Dans le cas de la solubilisation à 20°C, la gomme de caroube purifiée, extraite à température ambiante, possède les meilleures propriétés de solubilité. Cette tendance pourrait s'expliquer par la sélection, lors de la purification, de galactomannanes riches en galactose et donc plus solubles. Les galactomannanes ayant un ratio mannose/galactose plus élevé n'auraient pas été mis en solution lors de la purification.

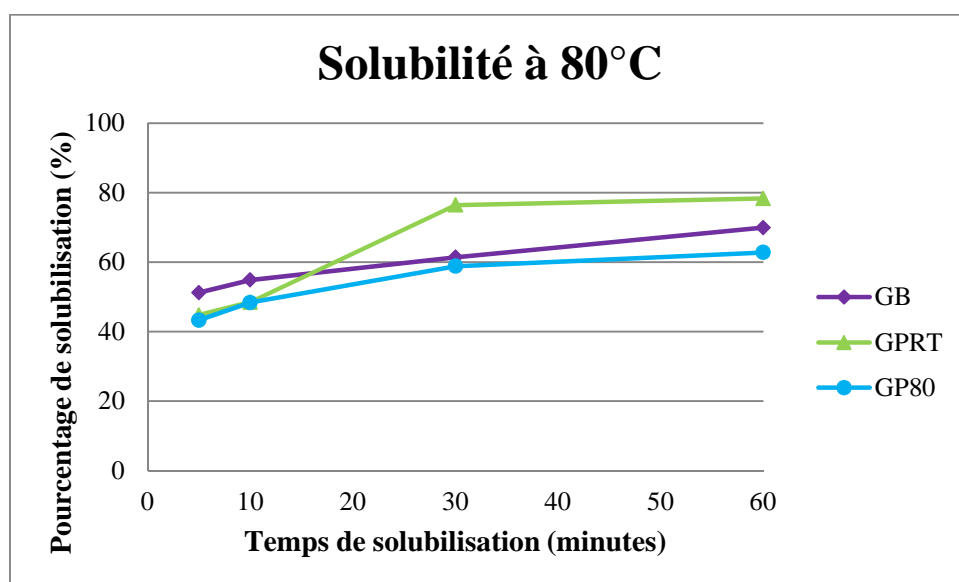


Figure 18. Cinétique de solubilité dans l'eau à 80°C des gomme de caroube brute et purifiées (GB = gomme de caroube brute, GPRT = gomme de caroube purifiée à température ambiante, GP80 = gomme de caroube purifiée à 80°C).

Lors de la solubilisation à 80°C, les trois types de gomme présentent une cinétique de solubilisation similaire. A cette température, les galactomannanes sont solubles dans l'eau peu importe leur substitution en galactose. Cependant, la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante garde des propriétés de solubilité supérieures aux deux autres gommes comme dans le cas de la solubilisation à 20°C.

### V.1.3 COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES

La composition en monosaccharides (%) des différentes gommes et des culots résiduels d'extraction (section IV.1) est présentée dans le tableau 6.

Les facteurs de réponse pour chaque monosaccharide et les matières sèches des échantillons sont présentés en annexe 2.

Le taux de galactomannanes est obtenu par addition des pourcentages de mannose et de galactose. Quant au ratio mannose/galactose, il s'agit du rapport des compositions en mannose et en galactose.

**Tableau 6. Composition en monosaccharides (%), en galactomannanes (%) et ratio mannose/galactose pour les gommes de caroube brute et purifiées et pour les culots de purification. (GB, gomme de caroube brute ; GPRT, gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante ; Culot RT, culot issu de l'extraction à température ambiante ; GP80, gomme de caroube purifiée extraite à 80°C ; Culot 80, culot issu de l'extraction à 80°C).**

|                       | GB    | GPRT  | Culot RT | GP80  | Culot 80 |
|-----------------------|-------|-------|----------|-------|----------|
| Rhamnose              | 0,11  | 0,00  | 0,16     | 0,00  | 0,43     |
| Arabinose             | 1,04  | 0,32  | 1,64     | 0,50  | 5,25     |
| Xylose                | 0,27  | 0,25  | 0,29     | 0,26  | 0,76     |
| Mannose               | 71,12 | 77,58 | 76,68    | 80,40 | 27,60    |
| Glucose               | 0,79  | 0,00  | 0,17     | 0,25  | 1,02     |
| Galactose             | 16,48 | 21,43 | 15,99    | 18,24 | 9,18     |
| Galactomannanes       | 87,60 | 99,00 | 92,67    | 98,64 | 36,78    |
| M/G ratio             | 4,32  | 3,62  | 4,80     | 4,41  | 3,01     |
| Autres sucres simples | 2,20  | 0,57  | 2,26     | 1,01  | 7,46     |
| Sucres totaux         | 89,80 | 99,58 | 94,92    | 99,65 | 44,24    |
| Composés indéterminés | 10,20 | 0,42  | 5,08     | 0,35  | 55,76    |



Les taux de galactomannanes rencontrés dans les gommes brute et purifiées indiquent que les deux types de purifications ont permis d'éliminer une série de composés comme des protéines, des lipides, des minéraux, de la lignine et de la cellulose. Ces résultats sont en accord avec la composition de la gomme de caroube brute et purifiée présentée à la section II.2.2.1 (LOPEZ DA SILVA *et al.*, 1990, ANDRADE *et al.*, 1999). Seule, la quantité de galactomannanes dans la gomme brute est légèrement inférieure à la valeur attendue. Cette différence peut provenir de l'origine commerciale de la gomme de caroube.

Le culot de l'extraction à température ambiante contient une grande proportion de galactomannanes (92,67%) contrairement au culot de l'extraction à 80°C (36,78%). Dès lors, il apparaît qu'à solubilisation à température ambiante de la gomme brute, une partie des galactomannanes n'est pas mise en solution. A l'inverse, la purification à 80°C solubilise une plus large gamme de galactomannanes.

Les ratios mannose/galactose observés pour les différents types de gomme se situent dans la gamme attendue. En effet, la gomme de caroube présente un ratio mannose/galactose moyen égal à 4 (PARVATHY *et al.*, 2005 ; SITTIKIYOTHIN *et al.*, 2005). La gomme purifiée à température ambiante possède un ratio mannose/galactose plus faible que les deux autres types de gomme. La mise en solution à température ambiante sélectionne notamment les galactomannanes les plus riches en galactose. En effet, ceux-ci constituent la fraction soluble à faible température (MOREIRA *et al.*, 2008). A 80°C, la gomme de caroube peut être solubilisée totalement (section II.2.3). A l'inverse, le ratio mannose/galactose du culot issu de l'extraction à température ambiante est élevé ce qui indique qu'il est principalement composé de galactomannanes peu substitués. Ces observations corroborent les performances supérieures de solubilisation de la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante (section V.1.2). Cette gomme est riche en galactomannanes fortement substitués ce qui lui confère des propriétés de solubilité similaires à température ambiante et à 80°C.

Les quantités minoritaires de rhamnose, d'arabinose, de xylose et de glucose retrouvées dans les gommes sont en accord avec les travaux de LOPEZ DA SILVA *et al.* (1990). Elles proviennent probablement d'hémicelluloses et de substances pectiques. La purification élimine une partie de ces composés car ils sont concentrés dans les culots résiduels de purification.

Il a été observé que les surnageants de précipitation ne contenaient que de faibles traces en galactomannanes.

## V.1.4 ETUDE RHEOLOGIQUE

### V.1.4.1 PROPRIETES D'ECOULEMENT

Les propriétés d'écoulement ont été analysées pour les trois types de gomme à température ambiante et à 80°C (section IV.1.2.4). Deux types de courbe sont rencontrées : la contrainte tangentielle ou la viscosité apparente en fonction du gradient de vitesse (figure 19).

Les valeurs de viscosité à  $10 \text{ s}^{-1}$  et  $300 \text{ s}^{-1}$  sont présentées dans le tableau 7. La viscosité à  $10 \text{ s}^{-1}$  rend compte de la consistance en bouche du produit tandis que la viscosité à  $300 \text{ s}^{-1}$  met en évidence les propriétés d'écoulement du produit telles qu'elles pourraient être dans un procédé industriel notamment lors d'une étape de pompage (DAKIA *et al.*, 2008). Le seuil de plasticité s'exprime par la contrainte tangentielle initiale. Le facteur  $F_\eta$  correspond au gradient de vitesse nécessaire pour abaisser la viscosité initiale de 1 unité. Ce facteur permet de quantifier le caractère rhéofluidifiant.

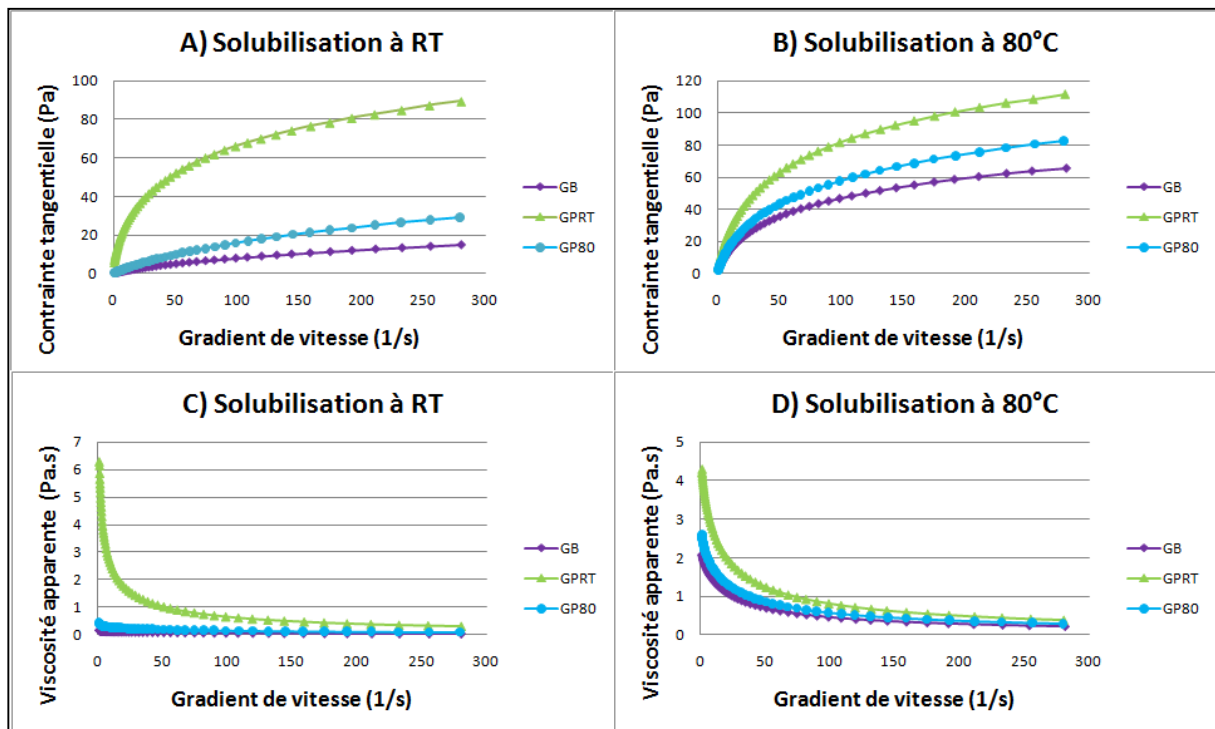


Figure 19. Propriétés d'écoulement de la gomme de caroube brute (GB) et des gommages purifiées extraites à température ambiante (GPRT) et à 80°C (GP80) : A) courbe d'écoulement à température ambiante, B) courbe d'écoulement à 80°C, C) courbe de viscosité à température ambiante, D) courbe de viscosité à 80°C.

La figure 19 montre que la contrainte tangentielle et la viscosité apparente varient en fonction du gradient de vitesse ; ce qui est caractéristique des fluides rhéofluidifiants ou pseudoplastiques. De plus, la contrainte tangentielle ne coupe pas l'axe des X en 0. La gomme de caroube présente un seuil de plasticité repris dans le tableau 7 comme étant la contrainte tangentielle initiale.

**Tableau 7. Paramètres de la viscosité à température ambiante et à 80°C des trois types de gommes de caroube : brute (GB), purifiée extraite à température ambiante (GPRT) et purifiée extraite à 80°C (GP80).**

|  | Solubilisation à température ambiante |      |      | Solubilisation à 80°C |      |       |
|--|---------------------------------------|------|------|-----------------------|------|-------|
|  | GB                                    | GPRT | GP80 | GB                    | GPRT | GP80  |
| Viscosité apparente initiale (Pa.s)              | 0,17                                  | 6,27 | 0,45 | 2,06                  | 4,23 | 2,51  |
| Viscosité apparente à 10 s <sup>-1</sup> (Pa.s)  | 0,13                                  | 2,52 | 0,28 | 1,40                  | 2,67 | 1,71  |
| Viscosité apparente à 300 s <sup>-1</sup> (Pa.s) | 0,05                                  | 0,32 | 0,10 | 0,23                  | 0,40 | 0,30  |
| Contrainte tangentielle initiale (Pa)            | 0,17                                  | 5,74 | 0,43 | 1,89                  | 3,89 | 2,25  |
| F <sub>η</sub> (s <sup>-1</sup> )                | n.d                                   | n.d  | 1,84 | 21,59                 | 1,25 | 14,78 |

Selon KÖK *et al.* (1999), la viscosité est dépendante de trois facteurs. Quand la température augmente, la viscosité diminue en raison du mouvement macromoléculaire accru et de la diminution du poids moléculaire dû à des dégradations thermiques. La viscosité augmente avec la température car la solubilité s'améliore.

Les pourcentages de solubilité semblent déterminer de manière prépondérante les propriétés de viscosité des trois types de gomme de caroube. La température de solubilisation devrait être un facteur augmentant la viscosité car permettant une meilleure solubilisation des galactomannanes. C'est le cas pour la gomme brute et la gomme purifiée extraite à 80°C. Pour la gomme purifiée extraite à température ambiante, sa composition riche en galactose lui permet d'obtenir une solubilisation élevée aussi bien à température ambiante qu'à 80°C.

Enfin, il a pu être observé que le mode séchage n'avait pas d'influence sur les propriétés d'écoulement.

### V.1.4.2 PROPRIETES VISCOELASTIQUES

Pour la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante (GPRT), l'évolution des modèles élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  en fonction de la fréquence à une contrainte de 1 Pa est illustrée à la figure 20, pour les deux températures de solubilisation (section IV.1.2.4). Le comportement viscoélastique des deux autres types de gomme est exposé en annexe 3.

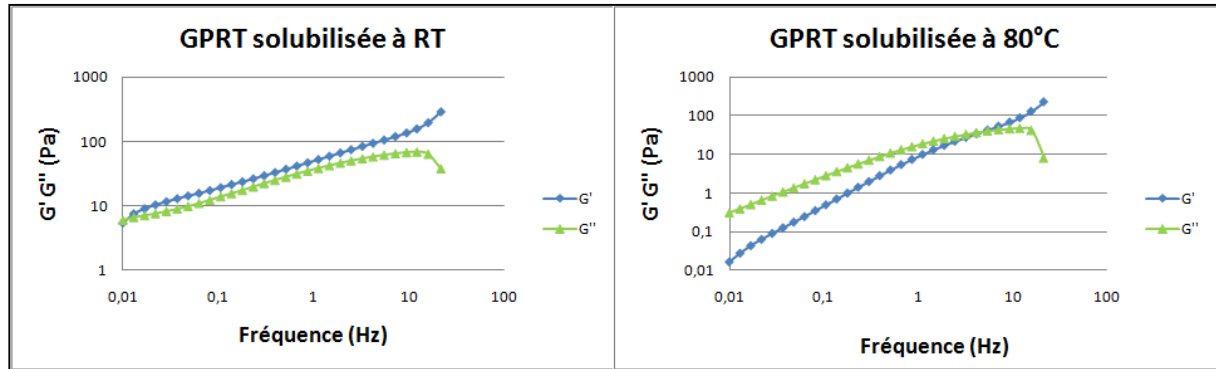


Figure 20. Propriétés de viscosité à 20°C et à 80°C de la gomme de caroube purifiée à température ambiante (GPRT).

Les six profils présentés sont caractéristiques d'un réseau enchevêtré. Il y a une intersection entre  $G'$  et  $G''$ . A faible fréquence,  $G''$  est plus grand que  $G'$ . Le caractère visqueux prédomine. A une certaine fréquence plus élevée,  $G'$  devient plus grand que  $G''$  et le caractère élastique est prépondérant. Dans le tableau 8, le point I correspond à la fréquence à laquelle la valeur de  $G'$  devient supérieure à  $G''$ .

Tableau 8. Paramètres de viscoélasticité à température ambiante et à 80°C des trois types de gommes de caroube : brute (GB), purifiée extraite à température ambiante (GPRT) et purifiée extraite à 80°C (GP80).

|                    | Solubilisation à température ambiante |        |       | Solubilisation à 80°C |       |       |
|--------------------|---------------------------------------|--------|-------|-----------------------|-------|-------|
|                    | GB                                    | GPRT   | GP80  | GB                    | GPRT  | GP80  |
| $G'$ à 1 Hz (Pa)   | 0,50                                  | 52,90  | 1,67  | 4,46                  | 9,92  | 10,07 |
| $G''$ à 1 Hz (Pa)  | 1,49                                  | 38,26  | 2,62  | 10,56                 | 19,10 | 12,12 |
| $G'$ à 10 Hz (Pa)  | 34,97                                 | 136,32 | 62,75 | 34,01                 | 68,17 | 98,27 |
| $G''$ à 10 Hz (Pa) | 6,54                                  | 67,08  | 46,17 | 28,47                 | 46,24 | 50,59 |
| I (Hz)             | 5,45                                  | 0,01   | 2,46  | 9,38                  | 5,45  | 1,90  |

Les régions non-substituées en galactose sont responsables des interactions intra- et intermoléculaires entre galactomannanes (BRUMMER *et al.*, 2003) (section II.2.3). La gomme de caroube possède un ration mannose/galactose parmi les plus élevés, il existe de fortes interactions entre les galactomannanes. Dès lors, des fréquences plus élevées sont nécessaires pour désenchevêtrer le réseau.

Cette observation est confirmée par le comportement viscoélastique des différentes gommes étudiées (figure 20, tableau 8 et annexe 3) excepté pour la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante et mise en solution à cette même température (figure 20). Ce phénomène est expliqué par la sélection d'une majorité de galactomannanes riches en galactose lors de la purification et de la mise en solution. Il existe peu d'interactions intra- et intermoléculaires car elles sont empêchées par la présence de galactoses. Des faibles fréquences sont suffisantes pour que la réponse élastique devienne supérieure à la réponse visqueuse.

A nouveau, il a été observé que le mode séchage n'avait pas d'influence sur les propriétés viscoélastiques.

### **V.1.5 CONCLUSION**

En raison de ses propriétés intéressantes, la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante a été sélectionnée pour la mise en œuvre des tests d'hydrolyse (sections IV.5 et V.6). Cette gomme présente de bonnes propriétés de solubilité. En effet, grâce à la sélection de galactomannanes riches en galactose lors de l'extraction à froid, son profil de solubilité est élevé, similaire à basse et haute température.

L'étape d'extraction à température ambiante permet d'obtenir une gomme de caroube possédant un ratio mannose/galactose moins élevé et des caractéristiques proches d'autres gommes plus substituées comme la gomme de guar et la gomme tara.

## V.2 EXTRACTION ET PURIFICATION DES $\beta$ -MANNANASES DE GRAINES DE CAROUBE EN GERMINATION

Un protocole de purification des  $\beta$ -mannanases extraites de graines de caroube en germination a été adapté de manière à intégrer des techniques plus modernes et plus rapides à mettre en œuvre, que les méthodes établies par MCCLEARY (1975 ; 1983a) (section V.2.1).

Différentes techniques de conservation des extraits enzymatiques ont été envisagées et testées. Le mode de stockage garantissant une stabilité de l'activité enzymatique  $\beta$ -mannanase et adapté à l'agencement des manipulations a été sélectionné (section V.2.2).

### V.2.1 *PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES $\beta$ -MANNANASES*

La figure 21 récapitule les étapes du protocole de concentration et de purification des  $\beta$ -mannanases et les dénominations des différents extraits obtenus.

Pour rappel, une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité nécessaire pour relâcher une nanomole de sucres réducteurs mesurés en équivalents mannose par minute sous les conditions définies du dosage (section IV.2.1).

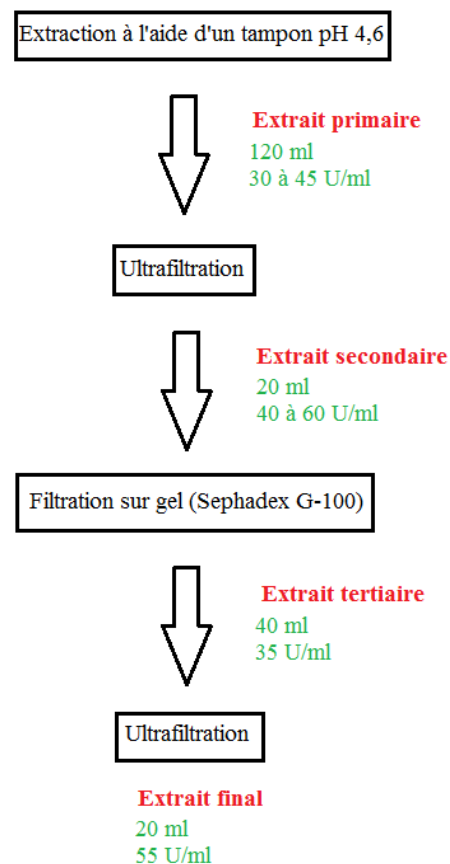


Figure 21. Schéma récapitulatif de la procédure de concentration et de purification des  $\beta$ -mannanases.

### **V.2.1.1 EXTRACTION DES $\beta$ -MANNANASES**

Les  $\beta$ -mannanases sont extraites de graines de caroube en germination (section IV.3.1) comme décrit à la section IV.3.2.

Le jus dilué contenant les  $\beta$ -mannanases est récupéré en fin d'extraction et constitue l'extrait enzymatique primaire (figure 21). Suivant le stade de germination, une activité  $\beta$ -mannanase de l'ordre de 30 à 45 U/ml est obtenue par dosage colorimétrique (section IV.2.1).

Une deuxième extraction des  $\beta$ -mannanases est opérée sur le rétentat de filtration. Une activité enzymatique minime est retrouvée dans l'extrait de deuxième extraction.

Le protocole établi (section IV.3.2) permet la récupération de la grande majorité des  $\beta$ -mannanases extraites par le tampon acétate pH 4,6. Une deuxième extraction n'est pas envisagée.

### **V.2.1.2 CONCENTRATION DE L'ACTIVITE $\beta$ -MANNANASE**

L'extrait primaire obtenu après extraction des  $\beta$ -mannanases des endospermes (section V.2.1.1) a été concentré par ultrafiltration (section IV.3.3).

Les résultats montrent que l'extrait secondaire (figure 21) obtenu possède une activité  $\beta$ -mannanase comprise entre 40 et 60 U/ml selon le stade de germination.

Le test enzymatique réalisé sur le filtrat est négatif. Il a permis de s'assurer de l'absence d'activité  $\beta$ -mannanase et du bon fonctionnement de l'unité d'ultrafiltration.

Alors que le volume est divisé par 6, l'activité enzymatique n'est pas concentrée six fois mais environ 1,3 fois. Cela s'explique premièrement, par la présence d'un volume mort sur la membrane. Une partie des enzymes reste sur la membrane et n'est pas récupérée. Deuxièmement, le test enzymatique colorimétrique peut être biaisé par la coloration initiale de l'extrait mais surtout par la viscosité de celui-ci. Une viscosité élevée entraîne une moins bonne dissolution de la tablette nécessaire à la réalisation du test (section IV.2.1). La viscosité de l'extrait enzymatique secondaire étant plus élevée que celle de l'extrait primaire en raison de l'étape de concentration, son activité  $\beta$ -mannanase risque d'être sous-estimée.

### V.2.1.3 PURIFICATION DES $\beta$ -MANNANASES

Une fois l'extrait enzymatique secondaire obtenu (section V.2.1.2), une étape de filtration sur gel est envisagée afin de purifier les  $\beta$ -mannanases en éliminant les composés de poids moléculaires éloignés (section IV.3.3).

A l'issue de la filtration, les quatre fractions présentant les plus grandes activités enzymatiques sont récupérées pour chaque colonne et mises en commun. L'extrait enzymatique tertiaire obtenu a un aspect translucide et non visqueux contrairement à l'extrait enzymatique secondaire. Cela sous-entend qu'une purification a été opérée. Cependant, l'activité enzymatique a été diluée et n'est plus que de 35 U/ml. La filtration sur gel aura purifié l'extrait enzymatique mais diminué la concentration en  $\beta$ -mannanases.

Une deuxième étape d'ultrafiltration est nécessaire pour retrouver une activité enzymatique de l'ordre de 55 U/ml, proche de celle de l'extrait enzymatique secondaire. Une unité d'ultrafiltration adaptée à de plus petits volumes aurait permis d'obtenir une activité enzymatique finale supérieure à l'extrait secondaire. En effet, l'unité d'ultrafiltration disponible ne permet pas de descendre sous les 20 ml.

L'extrait enzymatique final obtenu est aussi concentré que l'extrait secondaire mais plus pur. Par rapport à l'extrait tertiaire, il est aussi pur mais plus concentré.

Les extraits enzymatiques intermédiaires et finaux sont en réalité des cocktails enzymatiques car ils contiennent des activités  $\alpha$ -galactosidases et  $\beta$ -mannosidases en plus des  $\beta$ -mannanases.

Des étapes de chromatographie d'échange anionique et cationique ont été envisagées. Elles permettraient l'obtention d'extraits enzymatiques largement purifiés et concentrés et la réduction des activités enzymatiques parasites. Cependant, l'activité enzymatique  $\beta$ -mannanase est très sensible aux variations de pH nécessaires à la réalisation de ce type de chromatographie (section V.6.1). Ces voies ont été abandonnées.

Au cours du processus d'extraction et de purification (d'une durée de trois jours), une perte progressive de l'activité enzymatique a été constatée. La question de la conservation des extraits s'est alors posée. Ces aspects seront abordés dans la section suivante (V.2.2).



## **V.2.2 ETUDE DE LA STABILITE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE**

L'étude de la stabilité de l'extrait enzymatique pour la conservation, le dépistage de l'activité protéase est menée à l'aide d'extraits enzymatiques secondaires (figure 21, section V.2.1.2).

### **V.2.2.1 CONSERVATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE**

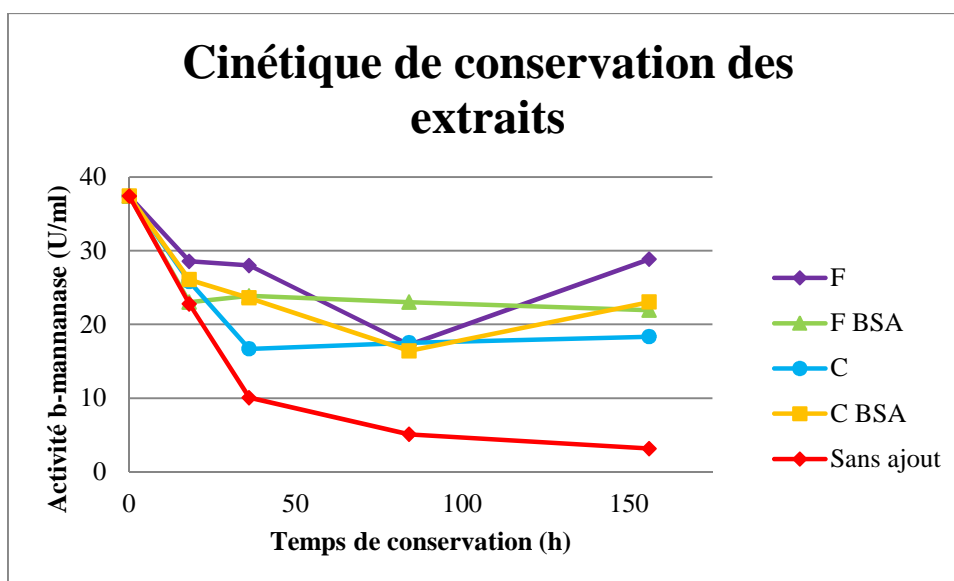
Lors des premiers essais d'extraction, une disparition de l'activité enzymatique a pu être mise en évidence suite à des étapes courtes de congélation ou de conservation au réfrigérateur. Il s'est avéré important d'améliorer la stabilité de la  $\beta$ -mannanase de caroube.

La première partie de l'étude de la conservation s'est intéressée au contenant. Le conditionnement dans des bouteilles en verre a été comparé à une conservation dans des tubes en polypropylène. Si les extraits sont conservés dans des flacons en verre en quelques heures l'activité  $\beta$ -mannanase disparaît. Les concentrations faibles rencontrées dans les extraits sont favorables à l'apparition de phénomènes d'adsorption des enzymes sur le verre causant la perte de l'activité enzymatique. Les extraits enzymatiques sont donc conservés dans des tubes en polypropylène (PP).

Cependant, la conservation dans des tubes en polypropylène est une condition nécessaire mais non suffisante à la conservation de l'activité enzymatique. Après quelques jours au congélateur ou au réfrigérateur, l'activité enzymatique tend à disparaître.

La possibilité d'une contamination microbienne a été considérée et l'ajout d'une faible quantité d'azide de sodium envisagé. Celui-ci permet l'éradication des contaminations bactériennes. Un ajout de sérum d'albumine bovine (BSA) a été étudié pour améliorer les propriétés de stabilité de l'extrait enzymatique. La BSA éliminerait une série d'effets négatifs dus aux interactions des enzymes avec les surfaces solides ou avec les interfaces air-liquide. Une comparaison entre la conservation au réfrigérateur et au congélateur a également été examinée.

L'influence du mode de conservation (congélateur ou réfrigérateur), de l'ajout d'azide de sodium et de BSA a été étudiée au cours du temps de conservation (section IV.3.4.1). Les résultats sont présentés à la figure 22.



**Figure 22.** Influence de la technique de conservation sur l'activité  $\beta$ -mannanase au cours du temps. (F = réfrigérateur + azide de Na, F BSA = réfrigérateur + azide de Na + BSA, C = congélateur + azide de Na, C BSA = congélateur + azide de Na + BSA).

De l'analyse de la figure 22, il apparaît qu'il n'y a pas de différences significatives entre les profils. Étant donné que les extraits produits ne doivent pas être stockés pendant de longues périodes mais sont rapidement utilisés, la conservation au réfrigérateur a été sélectionnée pour des raisons de praticité.

L'ajout de BSA n'a pas de grande influence sur les propriétés de conservation. Il n'est donc pas nécessaire d'en ajouter. Une concentration accrue en protéines aurait pu améliorer les propriétés de stabilité.

Un stockage au réfrigérateur dans des tubes en polypropylène en présence d'une faible quantité d'azide de sodium constitue un mode de conservation efficace et adapté aux expérimentations.

La présence d'azide de sodium permet alors le maintien d'une grande proportion de l'activité enzymatique. Par conséquent une contamination bactérienne pouvant intervenir lors de la germination des graines est suspectée (section V.2.2.2).

### V.2.2.2 DEPISTAGE DE L'ACTIVITE PROTEASE

Deux tests de dépistage de l'activité protéase ont été réalisés tous les deux sur des extraits enzymatiques secondaires : le premier (figure 23 A) en présence d'azide de sodium, le second (figure 23 B) sans azide de sodium. Pour rappel, la papaïne est utilisée comme témoin positif. Le blanc est réalisé avec de l'eau distillée (section IV.3.4.2).

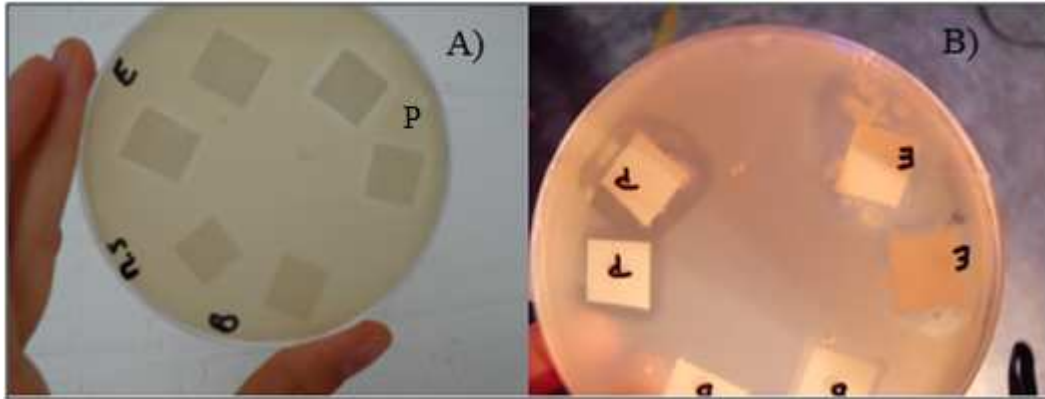


Figure 23. Tests de dépistage de l'activité protéase A) avec azide de Na B) sans azide de Na (B = blanc, P = papaïne et E = extrait enzymatique).

En présence d'azide de sodium, le papier filtre contenant l'extrait enzymatique ne présente pas d'auréole translucide. Cet extrait ne contient pas d'activité protéase. Sans azide de sodium, le milieu de culture au niveau de l'extrait présente des contaminations bactériennes et un halo translucide. Une activité protéase est présente. Elle provient certainement de microorganismes qui se sont développés lors de la germination. L'azide de sodium permet d'éliminer les microorganismes produisant des protéases.

### V.2.3 CONCLUSION

Le protocole de purification des  $\beta$ -mannanases permet l'obtention d'extraits enzymatiques concentrés mais contenant des activités  $\alpha$ -galactosidases et  $\beta$ -mannosidases. Une étape supplémentaire permettant d'éliminer ces enzymes parasites serait idéalement nécessaire. Les extraits seront conservés au réfrigérateur dans des tubes en polypropylène afin de réduire d'éventuels phénomènes d'adsorption sur le support. Ils subiront également un ajout d'azide de sodium pour maintenir l'activité  $\beta$ -mannanase, en prévenant toute contamination par des protéases bactériennes.

### **V.3 MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR MESURE DE LA VISCOSITE**

Lors de l'étape d'extraction des  $\beta$ -mannanases, la viscosité de l'extrait diminue au cours du temps. Sur base de cette observation, une méthode d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la variation de la viscosité au cours du temps a été mise en œuvre.

Des mesures seront réalisées sur les germes, les cotylédons et les endospermes afin de mettre en évidence les activités présentes dans les différentes parties de la graine en germination.

#### ***V.3.1 MISE AU POINT DES PARAMETRES D'ANALYSE***

La première étape de la mise en place des mesures est la détermination des paramètres de l'analyse. En effet, ceux-ci doivent être fixés de manière à ce que les variations observées lors des mesures ne soient dues qu'à des phénomènes enzymatiques et non pas aux propriétés rhéologiques des échantillons.

Des courbes d'écoulement sur une solution de gomme de caroube 2% w/v préparée dans le tampon pH 4,6 ont permis de déterminer un gradient de vitesse ( $s^{-1}$ ) auquel la gomme de caroube se comporte comme un fluide newtonien. A faibles cisaillements, les fluides rhéofluidifiants ont un comportement newtonien. Il est nécessaire de travailler dans cette gamme pour s'assurer que les variations de la viscosité observées ne soient pas d'origine rhéologique. Une vitesse de cisaillement de  $1 s^{-1}$  est sélectionnée. Les données sont enregistrées pendant trois heures à raison de une mesure par minute soit 180 points. La viscosité (Pa.s) est exprimée en fonction du temps (s) à un gradient de vitesse constant ( $1 s^{-1}$ ).

Des courbes d'écoulement aller-retour montrent que la gomme de caroube ne présente pas de caractères thixotropes et éliminent la possibilité d'un biais lors des mesures.

Les mesures sont réalisées à 30°C c'est à dire à la température d'extraction des  $\beta$ -mannanases (section IV.3.2).

#### ***V.3.2 MISE AU POINT DES MESURES***

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus pour les radicules, les cotylédons et les endospermes, il était nécessaire d'effectuer des mesures sur des blancs et des témoins.

Toutes les solutions analysées sont mélangées à l'aide d'un Ultra-turrax. Les temps d'attente avant la réalisation des mesures sont standardisés.

Les courbes sont exprimées en variation de viscosité par rapport au blanc.

### V.3.2.1 LES BLANCS

Deux types de blanc sont employés lors des mesures (figure 24). Le premier, correspondant à une solution de gomme de caroube 2% (section IV.2.2.1) est utilisé lors des mesures réalisées pour les radicules, les cotylédons et les enzymes commerciales. Le deuxième consiste en des endospermes désactivés (section IV.2.2.1). Il sert de blanc à l'étude de la production enzymatique des endospermes. Un blanc différent est nécessaire pour l'étude des endospermes car ils contiennent déjà des galactomannanes. Une solution de gomme de caroube n'est donc pas nécessaire. Ce sont les galactomannanes propres aux endospermes qui seront hydrolysés en cas d'activité enzymatique.

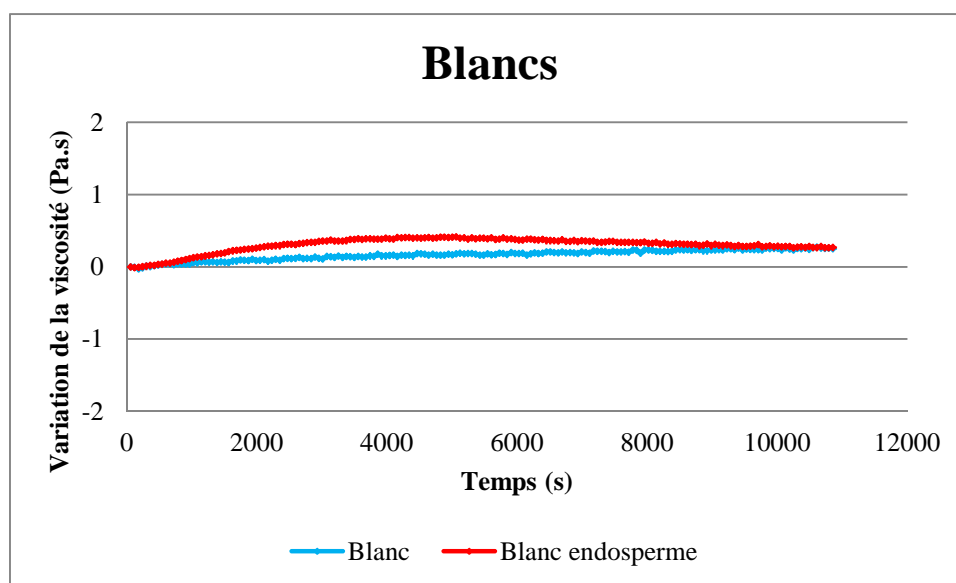


Figure 24. Profil de viscosité des blancs. (blanc = solution de caroube 2%, blanc endosperme = endospermes désactivés par chauffage).

### V.3.2.2 LES ENZYMES COMMERCIALES

Les enzymes commerciales vont servir de témoins. En effet, suivant le type d'activité enzymatique, les profils de viscosité obtenus sont différents. Ils sont repris à la figure 25 et exprimés en variation de la viscosité par rapport au blanc.

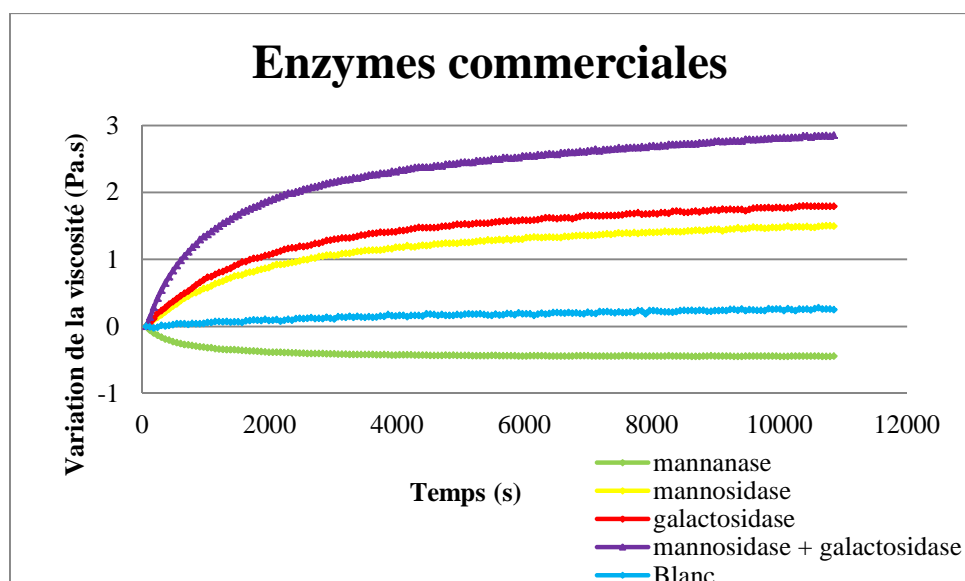


Figure 25. Profil de viscosité des enzymes commerciales sur une solution de caroube 2%.

Deux tendances nettes se dégagent. L'activité  $\beta$ -mannanase est responsable de la chute de la viscosité contrairement aux  $\alpha$ -galactosidases et aux  $\beta$ -mannosidases qui augmentent la viscosité de la solution au cours du temps. La  $\beta$ -mannanase étant une endo-enzyme, elle produit des oligosaccharides et donc des molécules de degré de polymérisation moins élevé que les galactomannanes initiaux (section II.4.1). Ceci explique la diminution de la viscosité. Quant à l' $\alpha$ -galactosidase, en hydrolysant les galactoses, elle augmente le nombre de zones non-substituées responsables des interactions intra- et intermoléculaires et donc la viscosité (section II.2.3). Le mélange d' $\alpha$ -galactosidases et de  $\beta$ -mannosidases permet l'obtention d'une viscosité deux fois plus élevée que les solutions contenant uniquement une des deux enzymes.

### V.3.2.3 LES RADICELLES, LES COTYLEDONS ET LES ENDOSPERMES

Au préalable de l'étude de la production enzymatique au cours du temps de germination, des tests préliminaires ont été réalisés sur des solutions contenant des radicules, des cotylédons ou des endospermes afin d'étudier les tendances et de déterminer un facteur permettant de rendre compte de l'activité enzymatique au cours du temps (section V.3.3).

Il est à noter que, pour les radicules et les cotylédons, le profil de viscosité constitue l'unique outil de mesure de l'activité enzymatique  $\beta$ -mannanase. En effet, les tests enzymatiques colorimétriques ne peuvent être mis en œuvre sur les extraits obtenus après purification et concentration. Ceux-ci possèdent une coloration jaune vif rendant impossible les mesures d'absorbance.

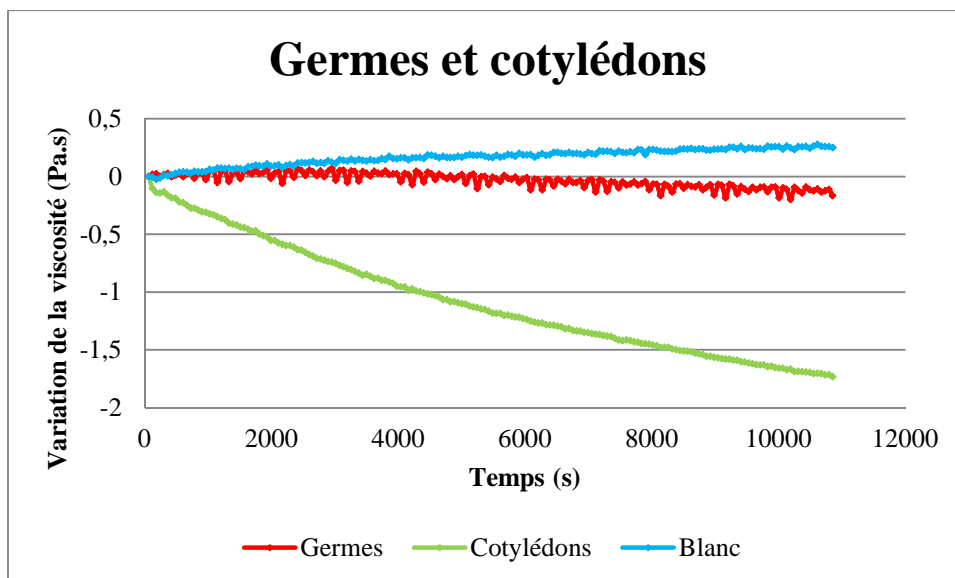


Figure 26. Profil de viscosité des radicules et des cotylédons sur une solution de gomme de caroube 2%.

D'après la figure 26, les radicules semblent posséder une faible activité mannosidase et/ou galactosidase. Quant aux cotylédons, une activité  $\beta$ -mannanase est retrouvée ce qui n'est pas en accord avec les observations de MCCLEARY (1975) qui a uniquement mis en évidence des activités  $\alpha$ -galactosidases et  $\beta$ -mannosidases.

En ce qui concerne la production enzymatique des endospermes, l'activité  $\beta$ -mannanase est prédominante et occasionne une chute rapide de la viscosité au début d'analyse (figure 27). Le profil concorde avec celui obtenu par hydrolyse de la gomme de caroube 2% par la  $\beta$ -mannanase commerciale.

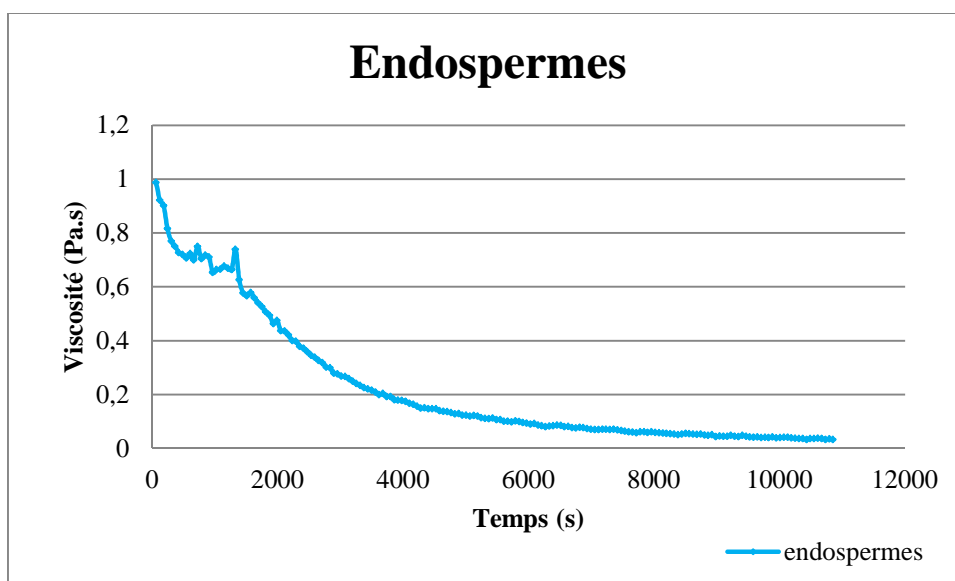


Figure 27. Profil de viscosité des endospermes broyés dans un tampon acétate pH 4,6.

### **V.3.3 EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE**

Les courbes, bien que très intéressantes, ne donnent que des indications qualitatives, des tendances. Pour permettre une analyse plus fine, le recours à des valeurs quantitatives, comparables entre elles, devrait être une nécessité.

L'opération mathématique choisie pour transformer les tendances en données chiffrées est la somme des carrés des écarts.

$$SCE = \int_{t=0}^{t=n} [\text{blanc}(t) - \text{échantillon}(t)]^2$$

La somme des carrés des écarts est calculée à partir des données relatives aux valeurs du blanc (solution de caroube 2%). Il permet de mettre en évidence les variations des courbes par rapport au profil du blanc.

Pour les endospermes, la somme des carrés des écarts n'est pas applicable pour rendre compte de l'activité enzymatique. Les endospermes ont déjà été partiellement hydrolysés au cours de la germination. Dès lors, la viscosité initiale est déjà influencée par l'activité enzymatique. De plus, celle-ci décroît très rapidement au début de la cinétique pour se stabiliser par la suite. Sur base de ces observations, la viscosité au temps initial constitue le facteur sélectionné pour l'évaluation de l'activité  $\beta$ -mannanase.

## **V.4 ETUDE DE LA PRODUCTION ENZYMATIQUE AU COURS DU TEMPS DE GERMINATION**

La méthode d'évaluation de l'activité enzymatique mise au point à la section V.3 va permettre l'étude de la production enzymatique au cours de la germination. Celle-ci est réalisée sur les radicules, les cotylédons et les endospermes récoltés à différents stades de développement (entre 6 et 9 jours).

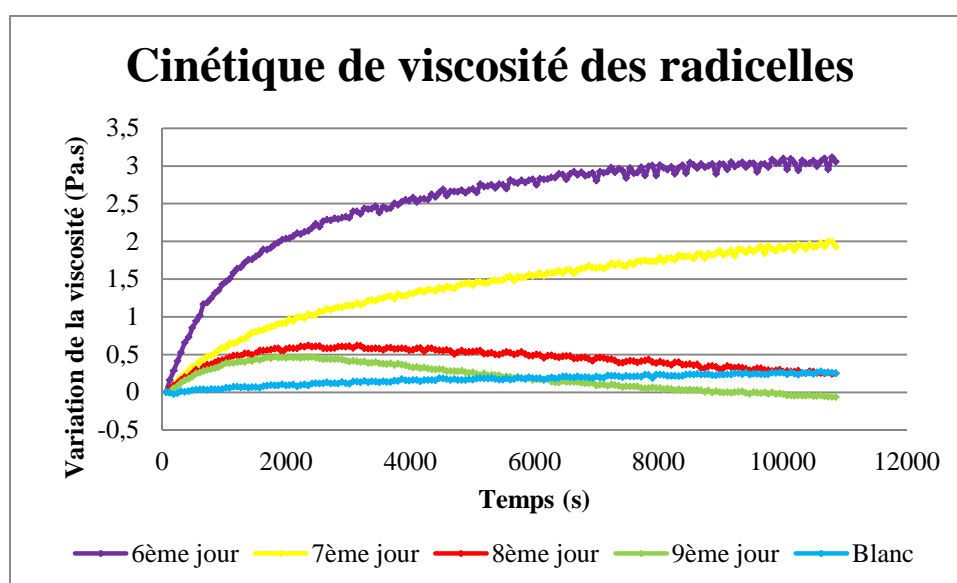
Les différentes solutions analysées au rhéomètre sont préparées de la même façon qu'à la section V.3.2.3.



#### V.4.1 ETUDE DE LA PRODUCTION ENZYMATIQUE DES RADICELLES

Les courbes présentées à la figure 28 pour les radicules sont exprimées en variation de la viscosité par rapport au blanc.

L'activité  $\alpha$ -galactosidase et/ou l'activité  $\beta$ -mannosidase est importante au sixième jour après la mise en germination et décroît rapidement avant de disparaître au huitième jour de germination. A partir du huitième jour de germination, l'activité enzymatique résiduelle est très petite. Une faible activité  $\beta$ -mannanase pourrait être observée.



**Figure 28.** Evolution des activités enzymatiques dans les radicules au cours du temps de germination par mesure de la viscosité.

Les sommes des carrés des écarts confirment les tendances annoncées (tableau 9). Celles-ci sont de plus soutenues par les travaux de MCCLEARY (1974) concernant les  $\alpha$ -galactosidases de la gomme de caroube. Il a mis en évidence un pic d'activité  $\alpha$ -galactosidase au sixième jour de germination. Celle-ci décroît par la suite rapidement. Quant à l'activité  $\beta$ -mannosidase, le pic est observé peu après la mise en germination et l'activité diminue continuellement jusqu'à disparition au huitième jour. De plus, il recense une activité  $\alpha$ -galactosidase dans le germe ainsi qu'une  $\beta$ -mannosidase.

**Tableau 9.** Evolution de la somme des carrés des écarts au cours de la germination en fonction de l'activité enzymatique des radicules.

| Stade de germination | 6ème jour | 7ème jour | 8ème jour | 9ème jour |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SCE                  | 1040      | 294       | 18        | 9         |

### V.4.2 ETUDE DE LA PRODUCTION ENZYMATIQUE DES COTYLEDONS

Comme pour les radicules, les courbes (figure 29) sont exprimées en variation de la viscosité par rapport au blanc.

Pour les quatre stades de germination étudiés, les courbes restent toutes inférieures au blanc ce qui révèle la présence d'une activité  $\beta$ -mannanase. A partir du huitième jour de germination, l'allure des courbes de viscosité change et présente des paliers ou des remontées. Il semblerait que d'autres activités enzymatiques ( $\alpha$ -galactosidase et  $\beta$ -mannosidase) entrent en compétition avec l'activité  $\beta$ -mannanase.

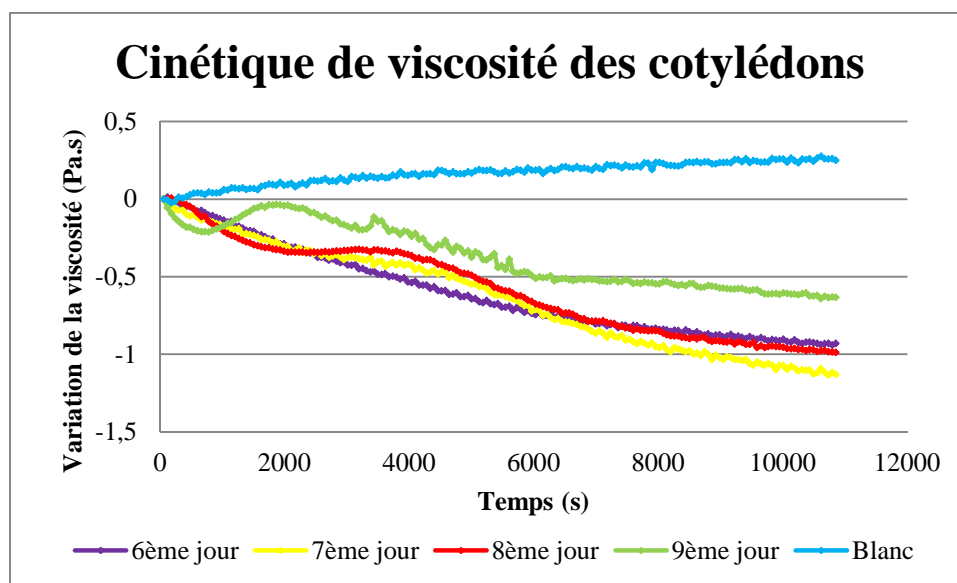


Figure 29. Evolution des activités enzymatiques dans les cotylédons au cours du temps de germination par mesure de la viscosité.

La somme des carrés des écarts (tableau 10) pourrait mettre en lumière l'augmentation de l'activité  $\beta$ -mannanase entre le sixième et le septième jour de germination. La diminution de la SCE durant les deux derniers stades illustreraient la compétition entre les différentes activités enzymatiques.

MCCLEARY (1975) ne répertorie pas de  $\beta$ -mannanases au niveau des cotylédons pour la gomme de caroube mais de grandes quantités d' $\alpha$ -galactosidases et de  $\beta$ -mannosidases.

Tableau 10. Evolution de la somme des carrés des écarts au cours de la germination en fonction de l'activité enzymatique des cotylédons.

| Stade de germination | 6ème jour | 7ème jour | 8ème jour | 9ème jour |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SCE                  | 128       | 144       | 123       | 64        |

### V.4.3 ETUDE DE LA PRODUCTION ENZYMATIQUE DES ENDOSPERMES

La viscosité initiale des solutions d'endospermes est fortement dépendante du stade de germination (tableau 11). Elle diminue considérablement avec l'augmentation du temps de germination. Les galactomannanes contenus dans les endospermes sont mobilisés par hydrolyse pour assurer la croissance de la radicule. L'allure des courbes de viscosité (figure 30) est similaire à celle obtenue pour la  $\beta$ -mannanase commerciale. Ces deux observations confirment la présence d'une importante activité  $\beta$ -mannanase.

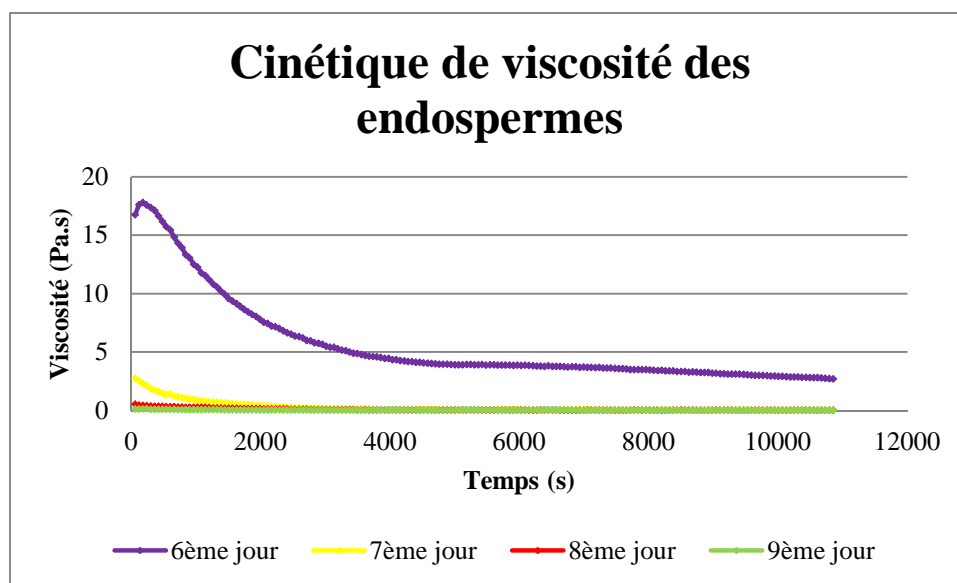


Figure 30. Evolution des activités enzymatiques dans les endospermes au cours du temps de germination par mesure de la viscosité.

Tableau 11. Evolution de la viscosité initiale en fonction du stade de germination des endospermes.

| Stade de germination      | 6 <sup>ème</sup> jour | 7 <sup>ème</sup> jour | 8 <sup>ème</sup> jour | 9 <sup>ème</sup> jour |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Viscosité initiale (Pa.s) | 16,754                | 2,7597                | 0,52776               | 0,11778               |

La viscosité initiale des solutions des 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jours ne permet plus de constater la présence de l'activité  $\beta$ -mannanase. Pourtant, des tests colorimétriques effectués sur des extraits secondaires produits à partir des endospermes récoltés aux deux stades la mettent en évidence (tableau 12). Les extraits enzymatiques secondaires sont obtenus en suivant le protocole d'extraction et de purification des  $\beta$ -mannanases (section V.2.1).

MCCLEARY (1975) situe le pic d'activité  $\beta$ -mannanase au niveau du neuvième jour de germination (figure 6). Les résultats obtenus lors des mesures en continu de la viscosité et des tests colorimétriques ne permettent pas de corroborer complètement cette thèse mais la tendance observée va dans ce sens.

En effet, la viscosité initiale continue de diminuer au cours du temps (figure 30). De plus, l'extrait enzymatique du 9<sup>ème</sup> jour présente une activité  $\beta$ -mannanase plus élevée que celle de l'extrait secondaire du 8<sup>ème</sup> jour (tableau 12).

**Tableau 12.** Evolution de l'activité  $\beta$ -mannanase (U/ml) des extraits enzymatiques secondaires obtenus à différents stades de germination (8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour).

| Stade de germination               | 8ème jour | 9ème jour |
|------------------------------------|-----------|-----------|
| Activité $\beta$ -mannanase (U/ml) | 42,356    | 55,328    |

#### V.4.4 CONCLUSION

Une méthode originale d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la viscosité a été mise au point. La somme des carrés des écarts est la formule mathématique permettant de chiffrer les tendances observées sur les courbes.

Les résultats observés pour les germes et les endospermes vont dans le sens des observations de MCCLEARY (1974, 1875). Cependant, pour les cotylédons, une activité  $\beta$ -mannanase est mise en évidence alors que ça n'a jamais été le cas pour la caroube.

Afin d'améliorer et d'augmenter la précision des mesures, il serait intéressant d'aller plus loin dans l'extraction des enzymes des différentes parties de la graine en germination. Il serait alors possible d'obtenir un extrait pur qui pourrait être appliqué sur une solution de gomme de caroube 2%.

De plus, il pourrait être envisagé de relier les sommes des carrés des écarts calculées aux mesures des activités enzymatiques réalisées par dosage colorimétrique par le biais d'une courbe d'étalonnage établie avec des solutions de concentrations croissantes en enzymes commerciales.

Les résultats obtenus peuvent être mis en relation avec la physiologie de la graine lors de la germination (section II.3). En effet, les galactomannanes sont mobilisés au cours de la germination pour la croissance du germe. Il est normal de retrouver l'activité  $\beta$ -mannanase la plus importante au niveau des endospermes car elle hydrolyse les galactomannanes en manno-oligosaccharides (MOS) et galacto-manno-oligosaccharides (GMOS). Une activité  $\beta$ -mannanase plus faible aurait été mise en évidence au niveau des cotylédons. Elle y côtoierait des activités  $\beta$ -mannosidases et  $\alpha$ -galactosidases. Cela justifie qu'au niveau des cotylédons, les MOS et les GMOS soient hydrolysés en oligosaccharides plus petits et en sucres simples. Enfin, au niveau des germes, des activités  $\alpha$ -galactosidases et  $\beta$ -mannosidases seraient présentes et leur permettraient de dégrader les oligosaccharides de petits degrés de polymérisation en sucres simples et de les utiliser pour son développement.

## V.5 MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE DES (GALACTO)-MANNO-OLIGOSACCHARIDES PAR AEC-PAD

Cette section est consacrée à la mise au point et à la validation d'une méthode d'analyse des manno-oligosaccharides et des galacto-manno-oligosaccharides par AEC-PAD. Celle-ci pourra, par la suite, être utilisée pour la caractérisation et la quantification des oligosaccharides produits en cours d'hydrolyse (section V.6).

### V.5.1 GRADIENT D'ELUTION

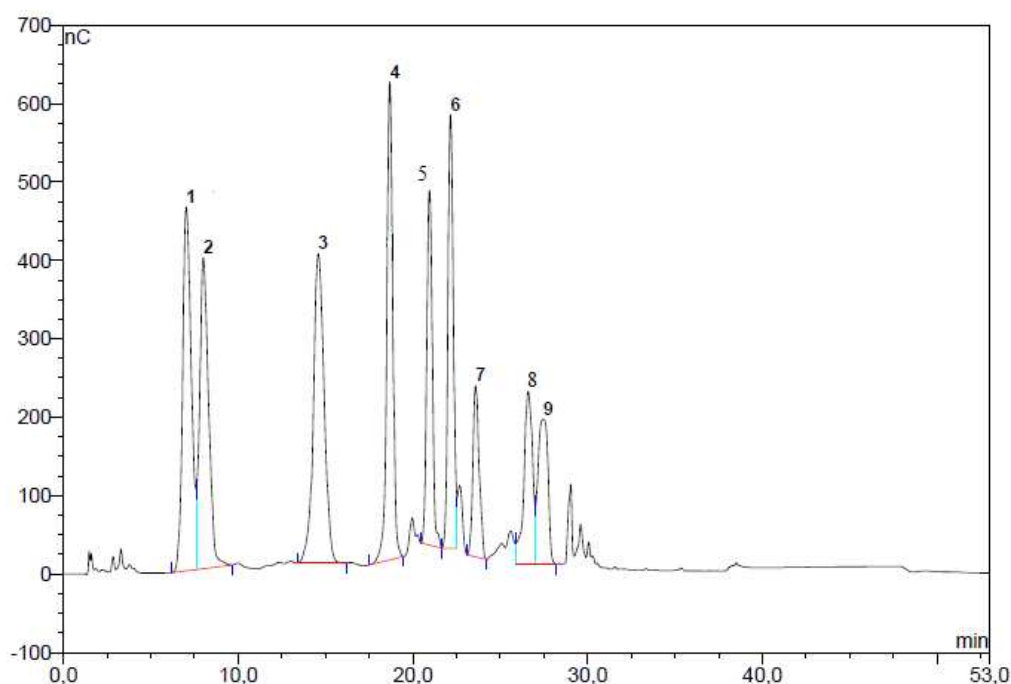
Le gradient d'élution AEC-PAD ayant permis une séparation satisfaisante des neuf standards est présenté dans le tableau 13. Le gradient de NaOH initial permet la séparation des deux sucres simples (galactose et mannose). Le gradient d'acétate de sodium en isocratie 100 mM NaOH affine la séparation entre les différents oligosaccharides (figure 31). La phase de lavage est réalisée à l'aide d'acétate de sodium et de soude concentrée. Une période de conditionnement permet de rétablir les conditions initiales pour l'analyse suivante.

**Tableau 13. Gradient d'élution de la méthode AEC-PAD d'analyse des (galacto)-manno-oligosaccharides. (solvant A = 100 mM NaOH, solvant B = 600 mM acétate de sodium + 100 mM NaOH, solvant C = 500 mM NaOH et solvant D = eau ultrapure).**

| Temps (minutes) | Solvant A (%) | Solvant B (%) | Solvant C (%) | Solvant D (%) |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0               | 20            | 0             | 0             | 80            |
| 15              | 30            | 0             | 0             | 70            |
| 17              | 100           | 0             | 0             | 0             |
| 20              | 100           | 0             | 0             | 0             |
| 35              | 90            | 10            | 0             | 0             |
| 36              | 90            | 10            | 0             | 0             |
| 36,1            | 0             | 50            | 50            | 0             |
| 46              | 0             | 50            | 50            | 0             |
| 46,1            | 20            | 0             | 0             | 80            |
| 53              | 20            | 0             | 0             | 80            |

Le chromatogramme AEC-PAD présenté à la figure 31 illustre le profil d'élution obtenu pour un mélange des neuf standards (0,1 mg/ml). Chaque pic numéroté correspond à un standard (tableau 14). La présence de résidus galactose allonge le temps d'élution comparé au manno-oligosaccharide de même degré de polymérisation non substitué. Les points critiques de l'élution sont la séparation du galactose et du mannose (pics 1 et 2) ainsi que celle du mannohexaose et du di-galactosyl-mannopentaose (pics 8 et 9). Des coefficients de résolution ont été calculés afin d'estimer la séparation de ces pics (sections IV.4.3.7 et V.5.2.7).

Mis à part les différents standards, des impuretés sont visibles sur le chromatogramme (figure 31). Il s'agit vraisemblablement d'oligosaccharides présents en traces dans les préparations de standards.



**Figure 31. Chromatogramme AEC-PAD du mélange des neuf standards.**

La pureté des standards estimée par AEC-PAD (tableau 14) est tenue en compte lors de la quantification. Certains oligosaccharides tels que le mannopentaose et la mannohexaose étaient annoncés purs à plus de 95% mais le sont beaucoup moins. Des phénomènes de dégradation sont probablement intervenus lors du transport ou du stockage de standards. Toutefois, les conditions de conservation préconisées ont été respectées scrupuleusement.

Bien que les temps de rétention ne soient pas toujours reproductibles en AEC-PAD, les temps de rétention moyens (tableau 14) ont été calculés pour chaque standard. et constituent une première approche dans l'identification des pics.

**Tableau 14. Numéro de pic, pureté et temps de rétention moyen pour les neuf standards.**

|                             | Numéro de pic | Pureté (%) | Temps de rétention moyen |
|-----------------------------|---------------|------------|--------------------------|
| Mannose                     | 1             | 100        | 7,05                     |
| Galactose                   | 2             | 100        | 8,03                     |
| Mannobiose                  | 3             | 100        | 14,64                    |
| Mannotriose                 | 4             | 93,11      | 18,71                    |
| Mannotetraose               | 5             | 85,06      | 20,97                    |
| Galactosyl-mannobiose       | 6             | 100        | 22,18                    |
| Mannopentaose               | 7             | 50,38      | 23,63                    |
| Mannoheptaose               | 8             | 75,96      | 26,67                    |
| Di-galactosyl-mannopentaose | 9             | 91,44      | 27,48                    |

Les performances de la méthode ont été évaluées pour les neuf standards par la détermination de sept critères de validation (sections IV.4.3 et V.5.2).

## **V.5.2 CRITERES DE VALIDATION**

### **V.5.2.1 DROITE D'ETALONNAGE ET LINEARITE**

La gamme de linéarité étudiée s'étend de 0,01 à 0,1 mg/ml. Celle-ci est suffisamment large pour les analyses considérées. Des concentrations supérieures n'ont pas été envisagées.

Les droites d'étalonnage pour chacun des standards sont présentées en annexe 4. Les équations des droites construites par régression linéaire aux sens des moindres carrés (section IV.4.3.1) et leurs coefficients de détermination sont présentés dans le tableau 15.

Les coefficients de détermination  $R^2$  valident les droites d'étalonnage pour chacun des standards. Ils sont tous supérieurs à 0,9890. Ces résultats sont satisfaisants selon GOFFIN *et al.* (2009) qui préconisaient des coefficients de détermination supérieurs à 0,9890.

**Tableau 15. Equations des droites d'étalonnage et coefficient de corrélation pour les neuf standards.**

|                             | Equation de la droite d'étalonnage | $R^2$  |
|-----------------------------|------------------------------------|--------|
| Mannose                     | $y=2443,2x+44,848$                 | 0,9890 |
| Galactose                   | $y=2238,4x+27,917$                 | 0,9892 |
| Mannobiose                  | $y=2818,5x+9,3751$                 | 0,9953 |
| Mannotriose                 | $y=2578,8x+11,481$                 | 0,9951 |
| Mannotetraose               | $y=1895,7x+18,961$                 | 0,9890 |
| Galactosyl-mannobiose       | $y=1965,5x+12,67$                  | 0,9908 |
| Mannopentaose               | $y=1748x+3,8452$                   | 0,9929 |
| Mannoheptaose               | $y=1641,3x+5,2131$                 | 0,9900 |
| Di-galactosyl-mannopentaose | $y=1292,7x+6,3893$                 | 0,9958 |

### **V.5.2.2 LIMITE DE DETECTION**

Les limites de détection sont toutes comprises entre 0,048 et 0,457  $\mu\text{g/ml}$  (tableau 16). Le mannohexaose et le di-galactosyl-mannopentaose possèdent les limites de détection les plus élevées. L'allure affaissée et étalée de leurs pics en est la cause.

### **V.5.2.3 LIMITE DE QUANTIFICATION**

Les limites de quantification reprises pour chaque standard dans le tableau 16 sont comprises entre 0,196 et 0,914  $\mu\text{g/ml}$ . Les deux sucres simples (galactose et mannose) détiennent les limites de quantification les plus basses. A l'inverse, le mannohexaose et le di-galactosyl-mannopentaose possèdent les limites de quantification les plus hautes en raison de l'étalement de leurs pics.

### **V.5.2.4 REPETABILITE DE L'INJECTION**

Les coefficients de variation exprimant la répétabilité de l'injection sont compris entre 0,56 et 3,39 (tableau 16). Ils sont largement inférieurs à la valeur limite acceptable (6%) fixée pour la concentration testée (0,1 mg/ml). Ces coefficients de variation indiquent une très bonne répétabilité de l'injection.

Pour tester la répétabilité de la méthode analytique totale, il aurait fallu injecter des solutions préparées à partir de prises d'essai différentes. Dans ce travail, seule la répétabilité de l'injection a été validée pour des raisons de disponibilité des standards.

### **V.5.2.5 REPRODUCTIBILITE DE L'INJECTION**

Les coefficients de variation relatifs à la reproductibilité varient entre 2,36 pour le mannose et 6,08 pour le mannohexaose. La méthode est reproductible car la valeur limite acceptable (12%) établie pour la concentration testée (0,1 mg/ml) n'est atteinte par aucun des standards.

Comme pour la répétabilité, l'étude de la reproductibilité s'est ciblée sur l'injection. La préparation de solutions à partir de prises d'essai différentes aurait permis d'évaluer la reproductibilité de la méthode analytique dans son entièreté.

### **V.5.2.6 JUSTESSE**

Les pourcentages de justesse vont de 90,41 à 106,08% et se situent à l'intérieur de l'intervalle limite acceptable (90 à 110%). Pour les neuf standards, la méthode est considérée juste à la lumière de ces résultats.



La justesse a été estimée sur base du biais entre les valeurs théoriques et calculées pour une seule concentration (0,1 mg/ml). Afin d'étendre l'étude de la justesse à la gamme de concentration entière, il aurait fallu comparer les pentes des droites théoriques et calculées.

**Tableau 16. Limites de détection, limites de quantification, pourcentages de justesse et coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité pour les neufs standards.**

|                             | LOD<br>(µg/ml) | LOQ<br>(µg/ml) | Répétabilité<br>(%) | Reproductibilité<br>(%) | Justesse<br>(%) |
|-----------------------------|----------------|----------------|---------------------|-------------------------|-----------------|
| Mannose                     | 0,098          | 0,196          | 1,67                | 2,36                    | 99,85           |
| Galactose                   | 0,100          | 0,200          | 1,77                | 5,98                    | 92,44           |
| Mannobiose                  | 0,200          | 0,500          | 1,16                | 3,74                    | 102,89          |
| Mannotriose                 | 0,183          | 0,456          | 3,39                | 4,25                    | 96,36           |
| Mannotetraose               | 0,163          | 0,408          | 0,56                | 5,08                    | 95,22           |
| Galactosyl-mannobiose       | 0,204          | 0,510          | 1,00                | 4,29                    | 91,42           |
| Mannopentaose               | 0,247          | 0,494          | 1,56                | 3,20                    | 106,08          |
| Mannohexaose                | 0,365          | 0,775          | 1,99                | 6,08                    | 90,41           |
| Di-galactosyl-mannopentaose | 0,457          | 0,914          | 2,78                | 4,68                    | 98,97           |

### V.5.2.7 RESOLUTION DES PICS

Le coefficient de résolution R pour les pics de galactose et de mannose (1 et 2) est de 1,1 pour la concentration 0,1 mg/ml et de 1,54 pour la concentration 0,01 mg/ml. La résolution entre ces deux pics est satisfaisante pour permettre une quantification des deux sucres simples.

En ce qui concerne la qualité de séparation du pic de mannohexaose et du pic de di-galactosyl-mannopentaose, le coefficient de résolution s'élève à 0,82 pour une concentration de 0,1 mg/ml et à 0,84 pour une concentration de 0,01 mg/ml. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus pour le galactose et le mannose cependant ils sont jugés acceptables pour une quantification.

### V.5.3 CONCLUSION

La méthode AEC-PAD mise au point pour l'analyse des MOS et des GMOS présente de bonnes performances analytiques et a été validée pour sept critères. Une amélioration pourrait être apportée au niveau de la séparation des pics 1 et 2 (mannose, galactose) et des pics 8 et 9 (mannohexaose et di-galactosyl-mannopentaose).

Toutefois, cette méthode est d'ores et déjà applicable à un large panel d'applications telles que l'analyse d'hydrolysats de galactomannanes d'origine botanique diverse obtenus par action d'enzymes microbiennes fongiques ou d'origine végétale ou par d'autres techniques d'hydrolyse.

## V.6 ANALYSE ENZYMATIQUE

La méthode AEC-PAD mise au point à la section V.5 va servir à la quantification d'oligosaccharides produits par hydrolyse de la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante (section V.1) par des extraits enzymatiques provenant du protocole de purification des  $\beta$ -mannanases établi à la section V.2. Une hydrolyse est réalisée à l'aide d'un extrait enzymatique secondaire, l'autre avec un extrait final (issu de la filtration sur gel) (section V.2.1).

Au préalable de ces hydrolyses, des tests sont réalisés de manière à choisir la température et le pH optimaux.

### V.6.1 OPTIMISATION DES PARAMETRES D'HYDROLYSE

L'évolution de l'activité  $\beta$ -mannanase en fonction de la température et du pH (section IV.5.1) permet la détermination des paramètres (pH, température) optimaux en vue de la mise en place de tests d'hydrolyse (figure 32) (section V.6.2).

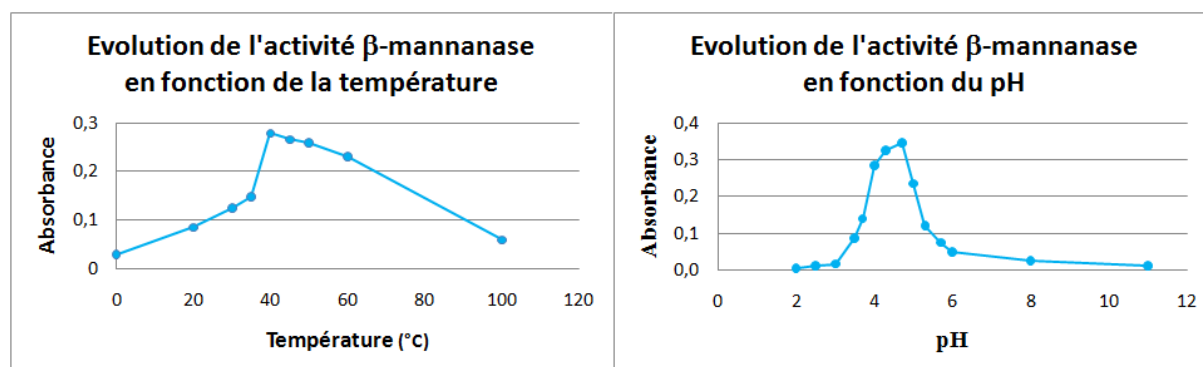


Figure 32. Evolution de l'activité  $\beta$ -mannanase en fonction de la température et du pH.

A 40°C, l'activité  $\beta$ -mannanase est à son maximum. Quant au pH, on peut remarquer que les  $\beta$ -mannanases de caroube sont sensibles aux variations de pH et ne possèdent qu'une faible gamme de stabilité. L'optimum de pH s'élève à 4,7.

Il est à noter que les tests enzymatiques colorimétriques et le protocole d'extraction et de purification des  $\beta$ -mannanases sont effectués dans des conditions optimales de pH et de température.

Sur base des résultats obtenus (figure 32), les tests enzymatiques (sections IV.5.2 et V.6.2) seront effectués à 40°C et à pH 4,6.

### V.6.2 ANALYSE DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

L'analyse des extraits enzymatiques obtenus à la section V.2.1 rend compte du profil d'hydrolyse des  $\beta$ -mannanases. En effet, celles-ci se retrouvent dans un extrait enzymatique avec des galactomannanes. Durant les procédés d'extraction, de purification et la conservation au réfrigérateur, elles hydrolysent ces polysaccharides en molécules de degré de polymérisation plus petites. Cependant, il ne faut pas négliger la présence d' $\alpha$ -galactosidases et de  $\beta$ -mannosidases dans le cocktail enzymatique.

L'extrait enzymatique secondaire (ultrafiltré) (figure 33) présente à l'inverse de l'extrait final (issu de la filtration sur gel) (figure 34) des pics correspondant vraisemblablement à des oligosaccharides de haut degré de polymérisation. Ces composés ont été éliminés lors de la filtration sur gel.

De plus, l'extrait enzymatique ultrafiltré est plus concentré en sucres simples et en oligosaccharides que l'extrait final. Ils ont également été éliminés lors de l'étape de chromatographie d'exclusion.

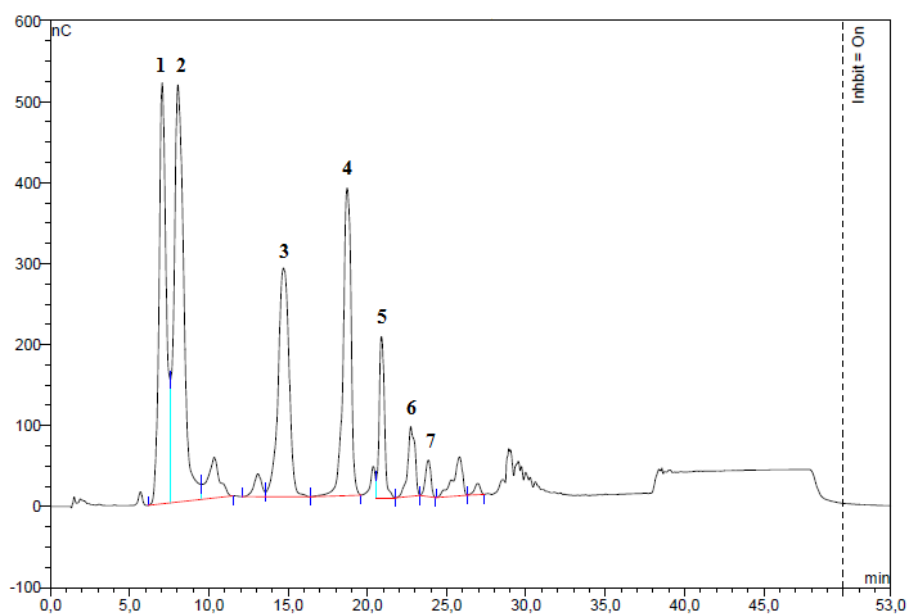
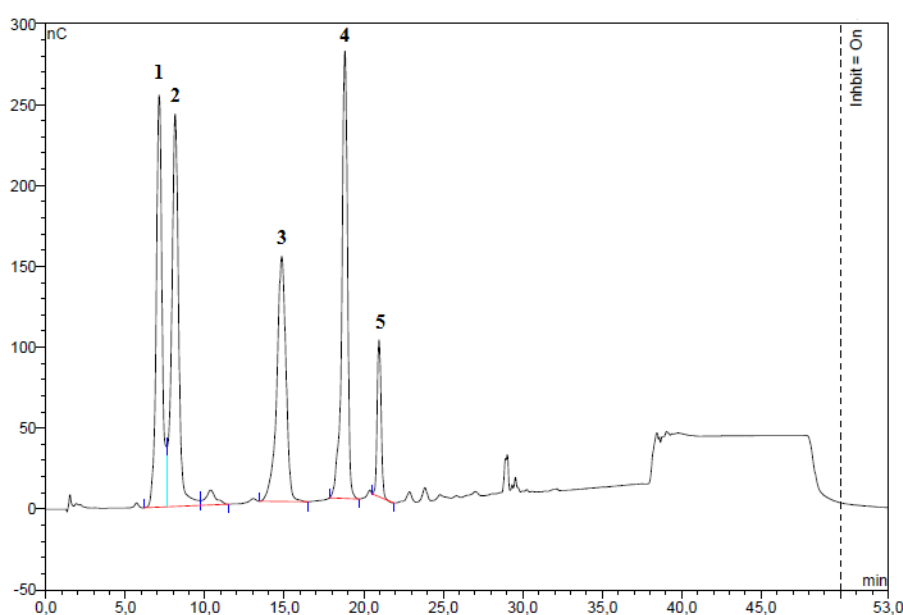


Figure 33. Profil en oligosaccharides de l'extrait enzymatique secondaire dilué 50 fois.

L'extrait enzymatique secondaire est riche en galactose (pic 1) et en mannose (pic 2) (figure 33). Cela indique la présence d' $\alpha$ -galactosidases et de  $\beta$ -mannosidases. Le mannobiose (pic 3), le mannotriose (pic 4) et le galactosyl-mannobiose (pic 6) sont aussi largement présents dans cet extrait. Ils peuvent être issus de l'hydrolyse par des  $\beta$ -mannosidases, par des  $\beta$ -mannanases ou par leurs actions cumulées. Les pics 5 et 7 de la figure 31 correspondant respectivement au mannotetraose et au mannopentaose résultent de l'action des  $\beta$ -mannanases. De plus, la présence de nombreux autres manno-oligosaccharides et galacto-manno-oligosaccharides est également suspectée par observation de l'allure du chromatogramme entre la 25<sup>ème</sup> et la 30<sup>ème</sup> minute (figure 33). Ces composés ne sont pas identifiables mais proviennent vraisemblablement de l'hydrolyse de la gomme de caroube par les  $\beta$ -mannanases.



**Figure 34. Profil en oligosaccharides de l'extrait enzymatique final dilué 50 fois.**

L'extrait enzymatique final (figure 34) est riche en galactose (pic 1) et en mannose (pic 2) provenant de l'hydrolyse par des  $\alpha$ -galactosidases et des  $\beta$ -mannosidases présentes dans le cocktail enzymatique. Il présente également de grandes quantités de mannobiose, de mannotriose et de mannotetraose (pics 3, 4 et 5). Les  $\beta$ -mannanases ont probablement dégradé la gomme de caroube en ces composés. Le mannobiose et le mannotriose peuvent également résulter de l'action de  $\beta$ -mannosidases.

Ces deux extraits enzymatiques sont employés pour l'hydrolyse de la gomme de caroube purifiée à température ambiante et séchée à l'air libre.

### V.6.3 CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DE LA GOMME DE CAROUBE PURIFIÉE À TEMPÉRATURE AMBIANTE

L'analyse des hydrolysats (figures 35 et 36) permet de corroborer le profil d'hydrolyse établi par analyse des extraits enzymatiques.

Pour les deux cinétiques d'hydrolyse, le temps initial correspond au moment où l'extrait enzymatique est mis en contact avec la solution de caroube.

En ce qui concerne l'hydrolyse par l'extrait enzymatique secondaire (figure 35), la production de galactose par les  $\alpha$ -galactosidases se stabilise au cours du temps.

Le mannose est issu de l'hydrolyse par les  $\beta$ -mannosidases de la gomme de caroube et de manno-oligosaccharides produits par les  $\beta$ -mannanases. Cette hypothèse est validée par la diminution des taux de mannotriose, de mannotetraose et de mannopentaose au cours du temps d'hydrolyse.

La concentration en mannobiose et en galactosyl-mannobiose augmente au fil des heures par action de  $\beta$ -mannanases et/ou de  $\beta$ -mannosidases.

La production de manno-oligosaccharides et de galacto-manno-oligosaccharides de plus hauts poids moléculaires continue à être observée au cours du temps. Cependant, ces composés, à peine relâchés par l'action des  $\beta$ -mannanases, subissent l'attaque des  $\alpha$ -galactosidases et des  $\beta$ -mannosidases. La conséquence est la sous-estimation de la production d'oligosaccharides par les  $\beta$ -mannanases.

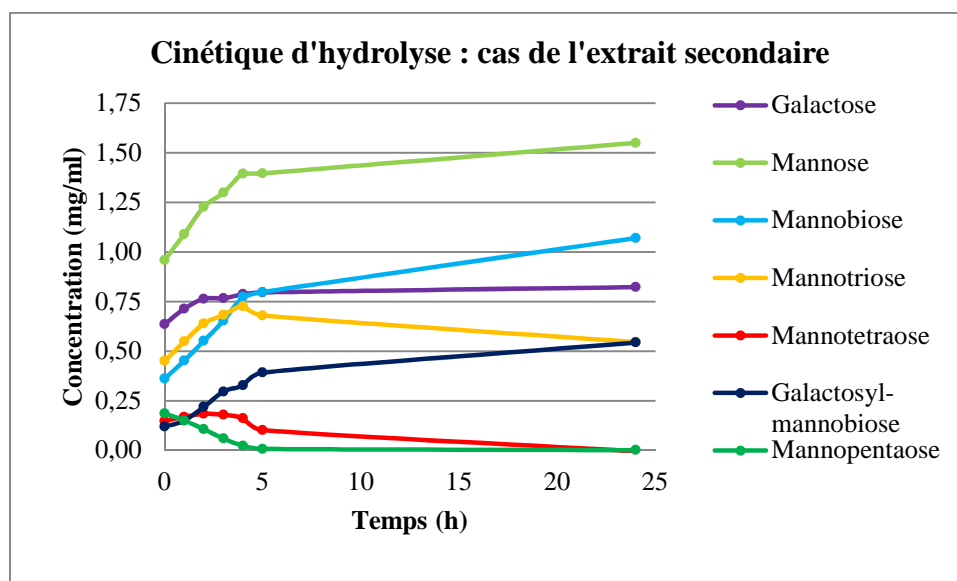


Figure 35. Cinétique d'hydrolyse de la gomme de caroube purifiée à température ambiante par un extrait enzymatique secondaire.

L'hydrolyse de la gomme purifiée à température ambiante par l'extrait enzymatique final (figure 36) présente un profil relativement similaire en sucres simples et oligosaccharides produits.

La quantité de galactose relâchée semble atteindre un palier au cours du temps. Du mannobiose et une faible quantité de galactosyl-mannobiose sont libérés pendant l'hydrolyse par action de  $\beta$ -mannanases et/ou de  $\beta$ -mannosidases.

Comme pour l'extrait enzymatique secondaire, le mannotetraose et les (galacto)-manno-oligosaccharides de plus haut degré de polymérisation (DP) non identifiés sont dégradés au fur et à mesure de leur production par les  $\alpha$ -galactosidases et les  $\beta$ -mannosidases. Il en résulte une concentration croissante en mannose.

En comparaison, des chromatogrammes au temps 0 et 24h de l'hydrolyse, il a été observé que des galacto-manno-oligosaccharides et manno-oligosaccharides de DP élevés étaient libérés.

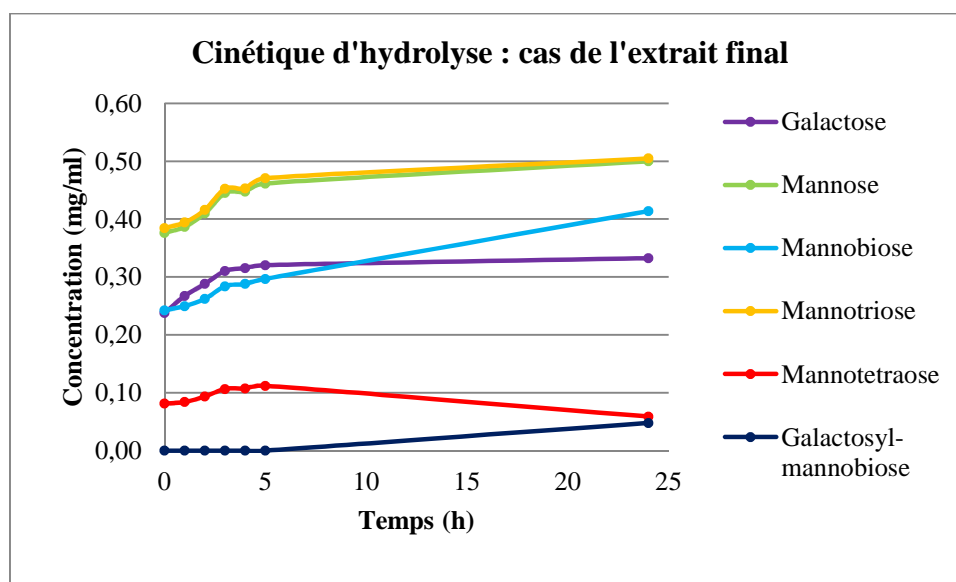


Figure 36. Cinétique d'hydrolyse de la gomme de caroube purifiée à température ambiante par un extrait enzymatique final.

#### V.6.4 CONCLUSION

Par la présence d'oligosaccharides, les tests d'hydrolyse confirment l'existence de l'activité  $\beta$ -mannanase. Cependant, en raison des activités  $\alpha$ -galactosidase et  $\beta$ -mannosidase, il est difficile de définir le mode d'action des  $\beta$ -mannanases de caroube sur base des profils en oligosaccharides obtenus.

En effet, l'action des  $\alpha$ -galactosidases modifie la substitution des galactomannanes et la répartition des résidus galactose. Ces changements influencent de manière considérable l'action des  $\beta$ -mannanases. Cette observation est corroborée par une étude réalisée à l'aide d'une  $\beta$ -mannanase commerciale. Elle a permis de démontrer que l'action préalable d'une  $\alpha$ -galactosidase sur la gomme de caroube modifiait le profil en oligosaccharides obtenus (LATINE *et al.*, 2010). La  $\beta$ -mannanase n'a pas clivé de manière identique la gomme traitée au préalable par une  $\alpha$ -galactosidase et la gomme non traitée.

Si le protocole d'extraction et de purification des  $\beta$ -mannanases (section V.2.1) était amélioré de manière à obtenir un extrait enzymatique pur, le mode d'action de celles-ci pourrait être déduit du profil en oligosaccharides.

Enfin, il serait intéressant de réaliser des analyses sur des échantillons prélevés entre la 5<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> heure d'hydrolyse afin de se rendre compte de l'évolution du profil en oligosaccharides.

## VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les deux objectifs de cette étude étaient la purification des  $\beta$ -mannanases extraites de graines de caroube en germination en vue d'étudier leur mode d'action et leur conservation, ainsi que la validation d'une méthode d'analyse AEC-PAD pour la caractérisation et la quantification des MOS et des GMOS.

Pour cela, la première partie de cette étude fut consacrée à la caractérisation de la matière première d'hydrolyse. Celle-ci a permis la mise en avant de la gomme de caroube extraite et purifiée à température ambiante. Par la sélection de galactomannanes riches en galactoses lors de la mise en solution, cette gomme présente une solubilité élevée aussi bien à basse température qu'à haute température. Cette particularité la rend intéressante pour la réalisation des tests d'hydrolyse. En effet, une bonne solubilisation optimise l'hydrolyse en rendant accessible aux enzymes une grande proportion de galactomannanes.

Ensuite, un protocole de concentration et de purification des  $\beta$ -mannanases extraites des endospermes des graines de caroube en germination a été établi. Les extraits enzymatiques obtenus possèdent une activité  $\beta$ -mannanase concentrée mais contiennent également des  $\beta$ -mannosidases et des  $\alpha$ -galactosidases dérangerantes pour l'étude du mode d'action des  $\beta$ -mannanases et pour la production d'oligosaccharides lors des hydrolyses. Le chapitre a également mis en évidence le fait que les extraits doivent être conservés au réfrigérateur dans des tubes en PP en présence d'azide de sodium. Cette technique de conservation a été sélectionnée lors d'une étude de stabilité des  $\beta$ -mannanases au cours du temps de stockage sous différentes conditions.

La troisième partie s'est intéressée à la mise au point d'une méthode originale d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la viscosité. Cette technique a pu mettre en évidence la présence d'une activité  $\beta$ -mannanase dans les cotylédons non recensée auparavant (MCCLEARY, 1974, 1983a). Ce protocole original s'est avéré performant dans la détermination des activités enzymatiques au niveau des différentes parties de la graine en germination.

Enfin, une méthode d'analyse AEC-PAD des (galacto)-manno-oligosaccharides a été mise au point et validée par sept critères de performance pour une gamme allant de 0,01 mg/ml et 0,1 mg/ml. Cette méthode a permis l'analyse des hydrolysats obtenus par action des extraits enzymatiques sur la gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante.

Au vue des résultats et des méthodes mises au point, cette étude offre de nombreuses perspectives.



En effet, notamment lors de la caractérisation du substrat d'hydrolyse, l'étude de la gomme de caroube extraite à température ambiante révèle que ses propriétés se rapprochent de celles d'autres gommes plus substituées telles que la gomme de guar et la gomme tara. Cette gomme pourrait notamment grâce à sa bonne solubilité à température ambiante présenter un intérêt pour l'industrie.

L'optimisation des paramètres d'hydrolyse a montré qu'à de relativement hautes températures (60°C), une grande majorité de l'activité  $\beta$ -mannanase était préservée. Il serait intéressant d'étudier sa stabilité au cours du temps à cette température. Si elle s'avérait relativement stable, elle pourrait présenter un grand intérêt industriel.

En ce qui concerne la méthode d'évaluation de l'activité enzymatique par mesure de la viscosité, cette technique pourrait, moyennant quelques améliorations, se substituer aux techniques de dosage colorimétrique quand celles-ci ne peuvent être mises en œuvre par exemple en raison des colorations des extraits enzymatiques qui introduisent un biais.

En outre, il serait opportun d'ajouter au protocole de purification des  $\beta$ -mannanases une étape hautement sélective permettant l'élimination des activités  $\beta$ -mannosidases et  $\alpha$ -galactosidases et la concentration de l'activité  $\beta$ -mannanase. La chromatographie d'affinité pourrait convenir à cette tâche. L'obtention d'un extrait enzymatique pur offre un large panel d'applications.

Il pourrait par exemple être envisagé d'appliquer directement cet extrait enzymatique pur sur une solution de caroube 2%. Des interférences seraient alors éliminées et permettraient une étude plus fine de l'évolution des activités enzymatiques au cours du temps de germination.

D'un point de vue théorique, un extrait enzymatique pur permettrait également l'étude du mode d'action des  $\beta$ -mannanases notamment par l'analyse des profils en oligosaccharides obtenus. Celui-ci ne serait plus parasité par des activités  $\beta$ -mannosidase et  $\alpha$ -galactosidase résiduelles.

D'un point de vue industriel, l'application d'un extrait pur sur un substrat purifié de préférence pourrait amener, après l'étude approfondie des propriétés prébiotiques des mélanges en oligosaccharides obtenus, à la commercialisation de nouveaux produits prébiotiques.

Finalement, la méthode AEC-PAD a montré qu'elle était applicable à l'analyse d'hydrolysats de galactomannanes de caroube. Elle pourrait être employée dans l'analyse de galacto-(manno)-oligosaccharides obtenus par hydrolyse d'autres sources de galactomannanes que la gomme de caroube et par utilisation d'autres enzymes ou d'autres types d'hydrolyse (haute pression, haute température par exemple).

## VII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADEMARK P. *et al.*, 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. *Journal of Biotechnology*, **63**, 199-210.

ADEMARK P. *et al.*, 1999. Hydrolytic properties of a  $\beta$ -mannosidase purified from *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, **75**, 281-289.

ANDRADE C. T., AZERO E. G., LUCIANO L. & GONCALVES M. P., 1999. Solutions properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparaison with locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, **26**, 181-185.

AVALLONE R., PLESSI M., BARALDI M. & MONZANI A., 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis*, **10**, 166-172.

BEWLEY J. D., 1997. Breaking down the walls – a role for endo- $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy. *Trends in plant science*, **2**, 464-469.

BINER B. *et al.*, 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, **100**, 1453-1455.

BLECKER C., 2009. Ingénierie des formulations alimentaires. Notes de cours : Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique).

BOUZOUITA N. *et al.*, 2007. The analysis of crude and purified locust bean gum: a comparaison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry*, **101**, 1508-1515.

BRESOLIN T. M. *et al.*, 1997. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannans systems. *Carbohydrate polymers*, **33**, 131-138.

BRUMMER Y., CUI W. & WANG Q., 2003. Extraction, purification and physiochemical characterization of fenugreek gum. *Food Hydrocolloids*, **17**, 229-236.

CORREIA P. J. & MARTINS-LOUCAO M. A., 2005. The use of macronutrients and water in marginal mediterranean areas: the case of carob tree. *Field Crops Research*, **91**, 1-6.

DAAS P. J. H., SCHOLS H.A. & DE JONGH H. H. J., 2000. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate research*, **329**, 609-619.

DAKIA P. A., 2003. *Extraction et caractérisation de la gomme de caroube (Ceratonia siliqua L.)*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

DAKIA P. A., WATHELET B. & PAQUOT M., 2007. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry*, **102**, 1368-1374.

DAKIA P. A. *et al.*, 2008. Composition and physiochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid and water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, **22**, 807-818.

DAKIA P. A., 2009. *Propriétés chimiques et rhéologiques des polysaccharides de l'endosperme des graines de caroubier (Ceratonia siliqua L.)*. Thèse de doctorat : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

DEA I. C. M. & MORRISON A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **31**, 241-242.

DEKKER R. F. H. & RICHARDS G. N., 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*, **32**, 277-352.

DEY P. M. & PRIDHAM J. B., 1972. Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **36**, 91-130.

FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>, (13/03/10).

FERREIRA H. M. & FILHO E. X. F., 2004. Purification and characterization of a  $\beta$ -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydrate Polymers*, **57**, 23-29.

FIRON M., OFEK I. & SHARON N., 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of Enterobacteria. *Infection and Immunity*, **43**, 1088-1090.

GARTI N., MADAR Z., ASERIN A. & STERNHEIM B., 1997. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **30**, 305-311.

GODIN B., 2008. *Contribution à la production et à l'étude du relargage de substances volatiles sémiochimiques dans le cadre de la lutte biologique contre les pucerons*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

GOFFIN *et al.*, 2009. A step-forward method of quantitative analysis of enzymatically produced isomaltooligosaccharide preparations by AEC-PAD. *Chromatographia*, **69**, 287-293.

GOMES J. *et al.*, 2007. Production of thermostable  $\beta$ -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 969-975.

- GUBITZ G. M., HAYN M., SOMMERAUER M. & STEINER W., 1996. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii* : characterisation and synergism of two endo  $\beta$ -mannanases and a  $\beta$ -mannosidase. *Bioresource Technology*, **58**, 127-135.
- HEUSKIN S. *et al.*, 2009. Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) et *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae). *Journal of Chromatography A*, **1216**, 2768-2775.
- KAWAMURA Y., 2008. *Carob bean gum (Chemical and Technical Assessment for the 69th JECFA)*, [http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa/cta/69/Carob\\_bean\\_gum\\_CTA\\_69\\_.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa/cta/69/Carob_bean_gum_CTA_69_.pdf), (22/03/10).
- KÖK M. S., HILL S. E. & MITCHELL J. R., 1999. Viscosity of galactomannans during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. *Food Hydrocolloids*, **13**, 535-542.
- KURAKAKE M. *et al.*, 2006. Production of galacto-manno-oligosaccharides from guar gum by  $\beta$ -mannanase from *Penicillium oxalicum* SO. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, **54**, 7885-7889.
- LATINE R. *et al.*, 2010. Rapport de chimie biologique : les manno-oligosaccharides de caroube. Gembloux : Unité de Chimie Biologique et Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech.
- LOPEZ DA SILVA J. A., GONCALVES M. P., 1990. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, **4**, 277-287.
- MCCLEARY B. V. & MATHESON N. K., 1974.  $\alpha$ -D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, **13**, 1747-1757.
- MCCLEARY B. V. & MATHESON N. K., 1975. Galactomannan structure and  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase activity in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, **14**, 1187-1194.
- MCCLEARY B. V. & MATHESON N. K., 1976a. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, **15**, 43-47.
- MCCLEARY B. V., MATHESON N. K. & SMALL D. M., 1976b. Galactomannans and a galactoglucomannan in legume seed endosperms: structural requirements for  $\beta$ -mannanase hydrolysis. *Phytochemistry*, **15**, 1111-1117.
- MCCLEARY B. V., 1978. A simple assay procedure for  $\beta$ -D-mannanase. *Carbohydrate Research*, **67**, 213-221.

- MCCLEARY B. V., 1979a. Modes of action of  $\beta$ -mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans. *Phytochemistry*, **18**, 757-763.
- MCCLEARY B. V., 1979b. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume seed D-galacto-D-mannans. *Carbohydrate Research*, **71**, 205-230.
- MCCLEARY B. V., 1980. Hydrolysis of galactomannans by  $\alpha$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-mannanase. In: Marshall J. J., ed. *Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerisation*. New York, USA: Academic Press, 285-300.
- MCCLEARY B. V., 1982. Purification and properties of a  $\beta$ -D-mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydrate Research*, **101**, 75-92.
- MCCLEARY B. V., 1983a. Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- $\beta$ -mannanase. *Phytochemistry*, **22**, 649-658.
- MCCLEARY B. V., NURTHEN E., 1983b. Characterization of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with  $\beta$ -D-mannanase. *Carbohydrate Research*, **118**, 91-109.
- MCCLEARY B. V., 1988.  $\beta$ -D-Mannanase. *Methods in Enzymology*, **160**, 596-610.
- MOREIRA L. R. S. & FILHO E. X. F., 2008. An overview of mannan structure and mannan degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**, 165-178.
- MOURAO J. L. *et al.*, 2006. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, **126**, 107-120.
- MUSSATTO S. I. & MANCILHA I. M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Research*, **68**, 587-597.
- PARVATHY K. S., SUSHEELAMMA N. S., THARANATHAN R. N. & GAONKAR A. K., 2005. A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans. *Carbohydrate polymers*, **62**, 137-141.
- PATMORE J. V., GOFF H. D. & FERNANDES S., 2003. Cryo-gelation of galactomannans in ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, **17**, 161-169.
- PETIT M. D. & PINILLA J. M., 1995. Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **28**, 145-152.
- PINHEIRO V., GUEDES C. M., OUTOR-MONTEIRO D. & MOURAO J. L., 2009. Effects of fibre level and dietary mannanoligosaccharides on digestibility, caecal volatiles fatty acids and performances of growing rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, **148**, 288-300.

- POLLARD M. A. et al., 2007. Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. *Food Hydrocolloids*, **21**, 683-692.
- RASTALL R. A & MAITIN V., 2002. Prebiotics and symbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 490-496.
- SINDIC M., 2008. Physico-chimie. Notes de cours, Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique).
- SITTIKIYOTHIN W., TORRES D & GONCLAVES M. P., 2005. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, **59**, 339-350.
- THOMÉ O. W., 1885. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. 1 éd. Köhler : Gera (Allemagne).
- VENDRUSCOLO C. W. et al., 2009. Physiochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: effect of drying method. *Carbohydrate Polymers*, **76**, 86-93.
- VIEIRA I. G. P., MENDES F. N. P., GALLAO M. I. & DE BRITO E. S., 2007. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, **101**, 70-73.
- VULEVIC J., RASTALL R. A. & GILSON G. R., 2004. Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*, **236**, 153-159.
- WANG Y, 2009. Prebiotics: present and future in food science and technology. *Food Research International*, **42**, 8-12.
- WIELENGA W. C., 1990. Production and applications of seed gums. In: *Gums and Stabilisers for the Food Industry, Proceedings of 5th International Conference, Wrexham, July, 1989*. Oxford, UK: IRL Press, 383-403.
- XU B., HAGGLUND P., STALBRAND H. & JANSON J. C., 2002. Endo-  $\beta$ -1,4-mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization and mode of action. *Journal of Biotechnology*, **92**, 267-277.
- YOUSIF A. K. & ALGHZAWI H. M., 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food chemistry*, **69**, 283-287.
- ZAKARIA M. M., YAMAMOTO S. & YAGI T., 1998. Purification and characterization of an endo-1,4- $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. *FEMS Microbiology Letters*, **158**, 25-31.

## VIII ANNEXES

### ANNEXE 1

Tableau récapitulatif des réactifs utilisés lors des manipulations

| Réactif                      | Pureté (%) | Provenance     |
|------------------------------|------------|----------------|
| Ethanol                      | 98         | n.d            |
| Acétone                      | 99,9       | Scharlau       |
| Acide sulfurique             | 95         | VWR technical  |
| Hydroxyde d'ammonium         | 32,5       | VWR            |
| Diméthylsulfoxyde            | 99,9       | Sigma-Aldrich  |
| Tétrahydruroborate de sodium | 98         | Sigma-Aldrich  |
| Acide acétique               | 99,8       | Acros organics |
| Anhydre acétique             | 99         | VWR            |
| 1-Méthylimidazole            | 99         | Sigma-Aldrich  |
| Dichlorométhane              | 99,98      | Scharlau       |
| Rhamnose                     | 99         | Fluka          |
| Arabinose                    | 99         | Sigma-Aldrich  |
| Mannose                      | 99         | Fluka          |
| Galactose                    | 99         | Fluka          |
| Glucose                      | 99         | Merck          |
| Xylose                       | 99         | Fluka          |
| 2-Déoxy-d-glucose            | 99         | Acros organics |
| Trizma base                  | 99,9       | Sigma-Aldrich  |
| Acétate de sodium            | 99         | Sigma-Aldrich  |
| Azide de sodium              | 99         | Merck          |

## ANNEXE 2

Facteurs de réponse pour chaque monosaccharide et pourcentages de matières sèches des échantillons utilisés lors de la détermination des compositions en monosaccharides.

| Monosaccharide | Facteur<br>de<br>réponse |
|----------------|--------------------------|
| Rhamnose       | 0,87                     |
| Arabinose      | 1,2                      |
| Xylose         | 1,07                     |
| Mannose        | 0,97                     |
| Glucose        | 0,76                     |
| Galactose      | 1,12                     |

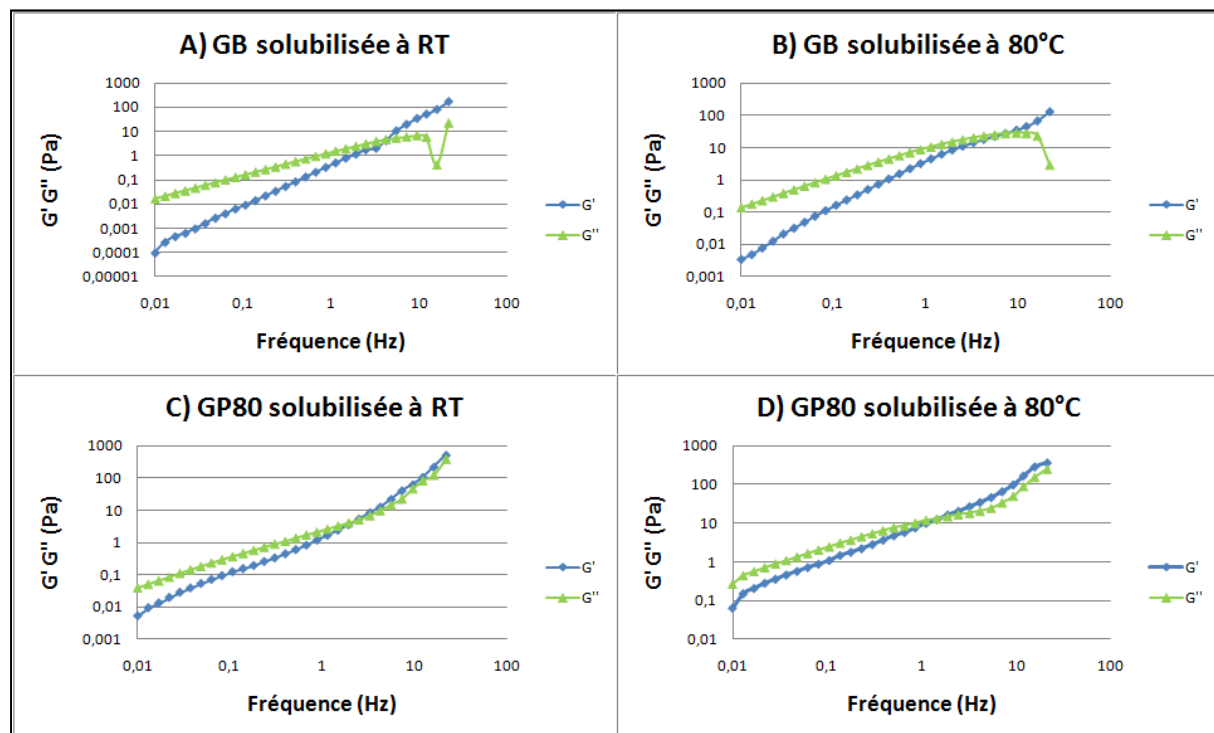
| Echantillon | % MS  |
|-------------|-------|
| GB          | 93,16 |
| GPRT        | 92,77 |
| Culot RT    | 93,53 |
| GP80        | 89,50 |
| Culot 80    | 92,80 |

GB = gomme de caroube brute, GPRT = gomme de caroube purifiée extraite à température ambiante, Culot RT = culot issu de l'extraction à température ambiante, GP80 = gomme de caroube purifiée extraite à 80°C, Culot 80 = culot issu de l'extraction à 80°C.



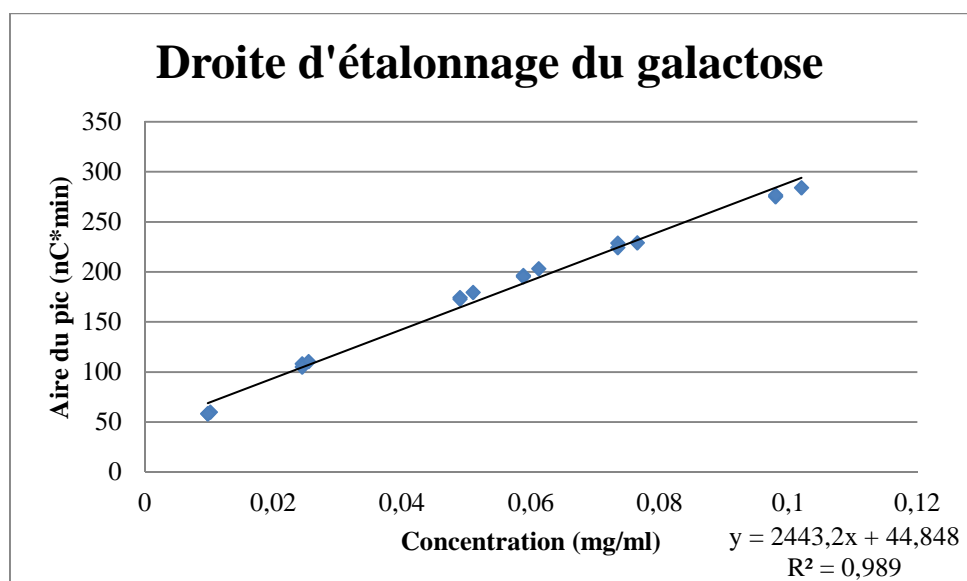
## ANNEXE 3

Propriétés viscoélastiques à 20°C et à 80°C de la gomme brute (GB) et de la gomme purifiée extraite à 80°C (GP80).

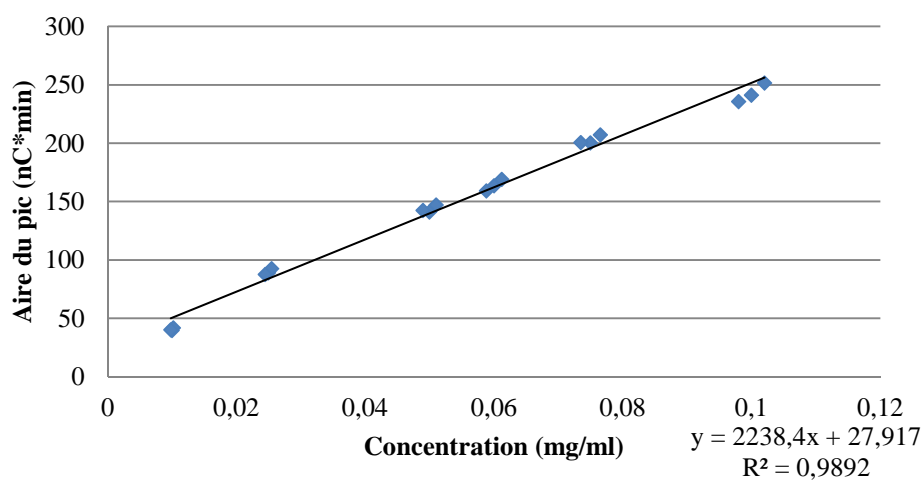


## ANNEXE 4

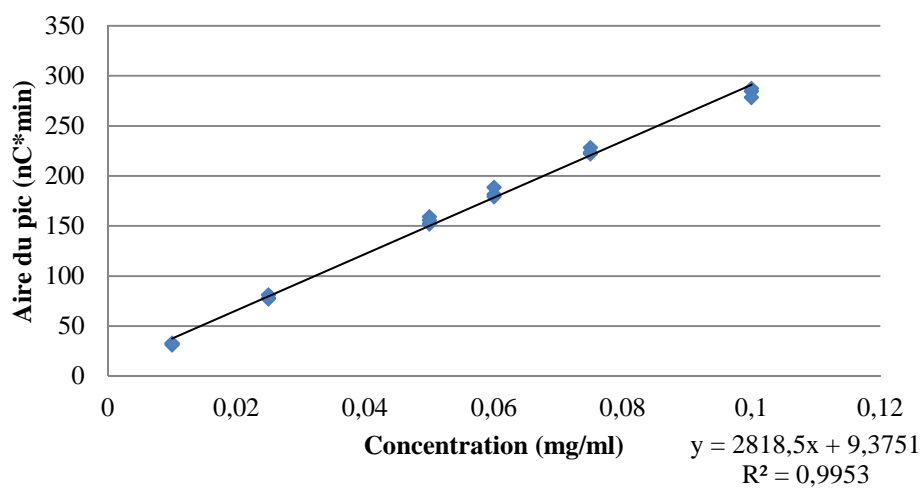
Droites d'étalonnage des neufs standards pour la validation de méthode AEC-PAD.



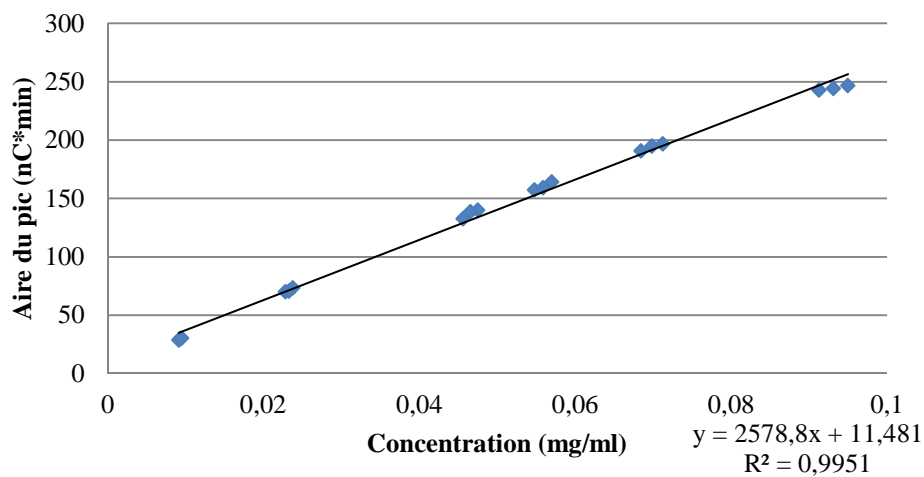
### Droite d'étalonnage du mannose



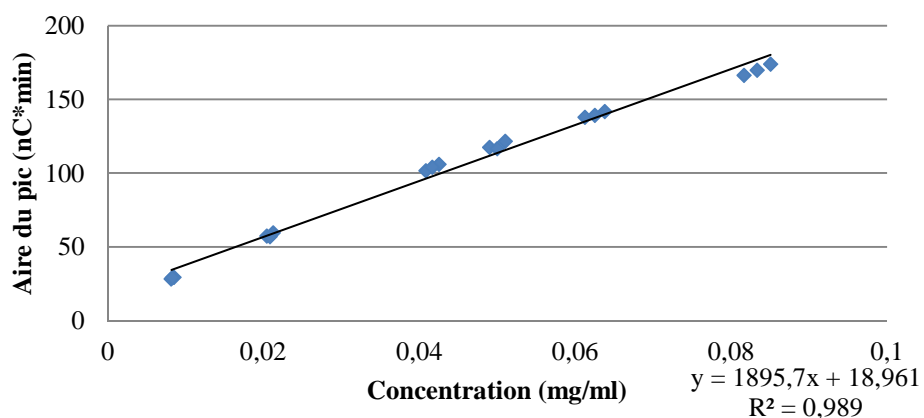
### Droite d'étalonnage du mannobiose



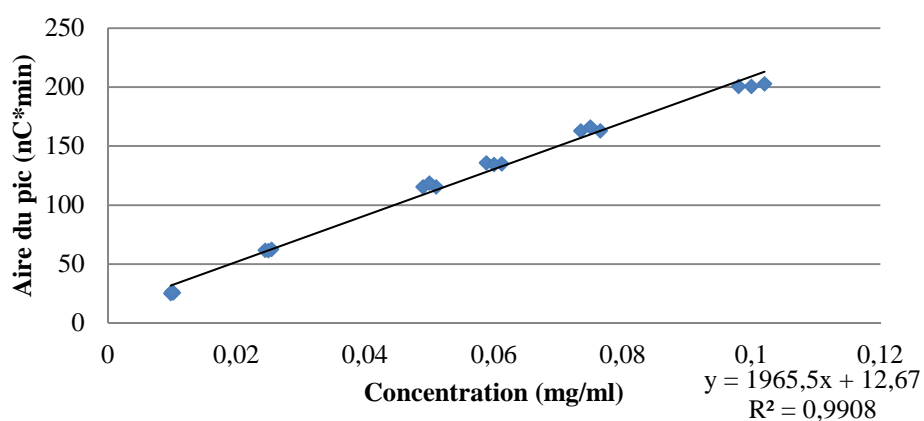
### Droite d'étalonnage du mannotriose



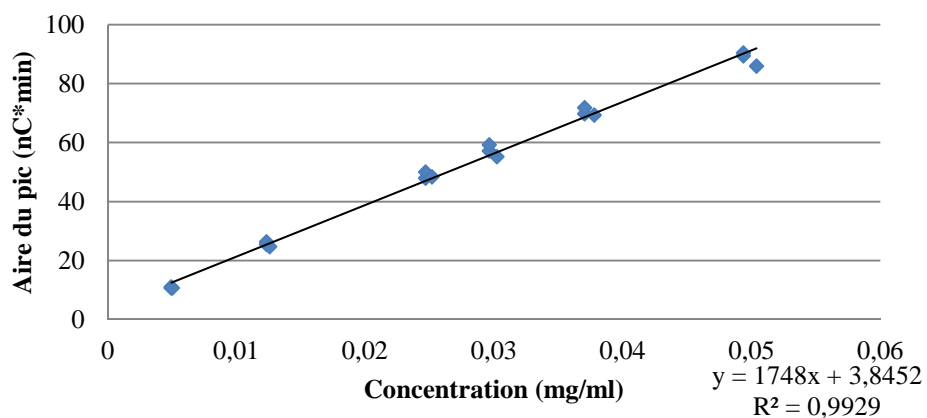
### Droite d'étalonnage du mannotetraose



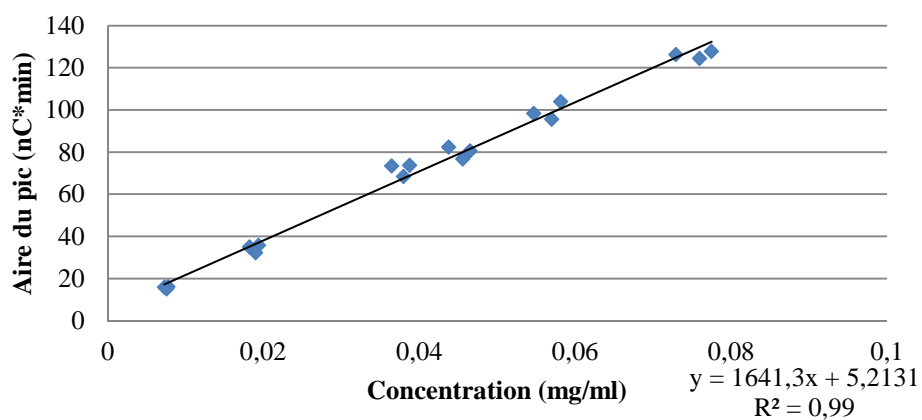
### Droite d'étalonnage du galactosyl-mannobiose



### Droite d'étalonnage du mannopentaose



### Droite d'étalonnage du mannohexaose



### Droite d'étalonnage du digalactosyl-mannopentaose

