

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr. Tahar Moulay de Saïda
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN BIOLOGIE

SPECIALITE : Biotechnologie végétale

Présenté par :

M. BOUDAOUED Lahcen Benameur

Melle BOUKABEN Imane

Intitulé :

Valorisation des sous produits de l'alimentation dans la synthèse des milieux de culture *In-vitro* - recherche des substituant d'Agar

Soutenu le 20/10/2015 devant la commission d'examen :

Mme HADJADJ Hassina	Maitre Assistant « A » . U de Saida	Présidente
Mme CHIKHI Amira	Maitre Assistant « A » . U de Saida	Examinateuse
M. HACHEM Kadda	Maitre de conférences « B » . U de Saida	Promoteur
Mme BENABDESSLEM Yasmine	Maitre de conférences « B » . U de Saida	Co-promotrice

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** pour nous avoir donné le courage et le souffle nécessaire pour achever ce modeste travail de recherche.

Au moment où nous achèvons ce travail, nous avons le plaisir de remercier tous ceux qui, par leurs encouragements, leur relecture et leur aide pratique ou simplement par leur confiance, ont contribué de façon importante à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont de prime abord à **M. HACHEM Kadda**, plus que Promoteur, il a joué pour nous un rôle de 'mentor' en étant toujours prêt à nous conseiller et à nous encourager. Son aide fut précieuse à bien des égards.

Nous exprimons ensuite notre estime et nos remerciements aux membres de notre jury : A **Mme CHIKHI Amira**, et à **Mme hadjadj Hassina**, qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse et de nous faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances.

Nous remercions également nos enseignants, qui m'ont formé durant les cinq ans de notre cursus (He oui ! le temps passe vite !), c'est à eux qu'on adresse toute la reconnaissance.

A **Mme BENABDESSLEM Yasmine**, de plus de ces instructions, elle a pris part activement au suivi des expérimentations, nous la remercions vivement et l'assurons de notre amitié.

Nous remercions également nos enseignants, qui nous ont formé durant toutes les années de notre cursus (He oui ! le temps passe vite !), c'est à eux qu'on adresse toute la reconnaissance.

Un grand merci est adressé à tout le personnel du laboratoire de répression des fraudes, CACQE - Saida, pour leur accueil et leur contribution pratique et intellectuelle à cette étude.

Un remerciement spécial, que nous adressons à **M. HAMMED Ahmed** pour toute l'assistance, la disponibilité, l'acharnement et les facilités qu'il nous a offert durant toute la période de la réalisation pratique de ce travail .

... Merci à vous !

Dédicace

Je dédie ce travail à :

À mes chers parents.

À mes frères Hocine et Mahfoud, et ma sœur Fatima Zohra.

À tout mes amis(e) et mes proches.

À la mémoire de "Yema".

B. Lahcen .

Aux joyaux de ma vie "mes parents" qui sont la source de ma réussite, je souhaite qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible témoignage de leurs efforts et sacrifices.

A mon chère frère ;

A mes chères sœurs ;

A tous mes proches ;

A toutes mes amies ;

A l'ensemble de tous les étudiants et étudiantes de ma promotion.

B. Imane

Table des matières

REMERCIEMENTS

DEDICACE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES PHOTOS

LISTE DES PLANCHES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ANNEXES

I.INTRODUCTION.....	02
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	05
I. 1. Les fruits dans l'alimentation humaine	05
I. 2. Valorisation des fruits.....	06
I. 2. 1. Fruits frais.....	06
I. 2. 2. Transformation des fruits	08
I.3. Valorisation des sous-produits issus de l'industrie des fruits.....	08
I. 3. 1. Cadre réglementaire lié à l'utilisation de sous-produits de fruits	08
I. 3. 2. Directions de valorisation de résidus de fruits	10
I. 3. 2. 1. Valorisation dans l'alimentation animale.....	11
I. 3. 2. 2. Valorisation par épandage et compostage	12
I. 3. 2. 3. Valorisation sous forme de biomasse et d'agro carburants	14
I. 3. 2. 4. Valorisation dans l'industrie alimentaire	16
II.1. Localisation des pectines : la paroi cellulaire végétale	18
II.1.1. Organisation anatomique et fonctions	18
II.1.2. Les principaux constituants de la paroi végétale	20
II.1.2.1. La cellulose.....	21
II.1.2.2. Les hémicelluloses	22
II.1.2.3. Les pectines	23
II.1.2.4. Les lignines	23

II.1.2.5. Les autres constituants	25
II.2. Les pectines : une classe de polysaccharide pariétal typique des végétaux	25
II.2.1. Sources de pectines à usages industriels	25
II.3. Propriétés chimiques des pectines	27
II.3.1. Solubilité des pectines	27
II.3.2. Stabilité des pectines	28
II.3.3. Groupements fonctionnels des pectines	28
II.3.3.1. Degré de méthylation	28
II.3.3.2. Degré d'acétylation (DAc)	29
II.3.3.3. Degré ferulique (DF)	39
III.4. Propriétés fonctionnelles des pectines	30
III.4.1. Propriétés gélifiantes des pectines.....	30
II.4.1.1. Gélification des pectines hautement méthylées (HM)	31
II.4.1.2. Gélification des pectines faiblement méthylées (LM)	33
II.5. Structures chimiques fines des pectines	35
II.5.1. Les différents domaines pectiques	35
II.5.2. Homogalacturonane	35
II.5.3. rhamnogalacturonane type I	36
II.5.4. rhamnogalacturonane type II	36
II.7. Application Potentielles des Fragments Pectiques	39
II.7.1. effet prébiotique des fragments pectiques	39
II.7.2. utilisation des fragments pectiques dans le domaine de la santé	49
II.7.3. Application des fragments pectiques dans le domaine agricole	40
III. MATERIELS ET METHODES	42
I. Objectif	42
II. Matériel végétal	42
III. Méthodes	42
III.1. Préparation et prélèvement des échantillons	42
III.2. Extraction des pectines	43
III.2.1. Première procédure	43
III.2.1.1. Les prétraitements	43
III.2.1.2. L'extraction	44

III.2.1. Deuxième procédure	51
II.2.1.1. Traitements préalables à l'extraction	51
II.2.1.2. Extraction des pectines	52
III.3. Reconstitution des milieux de culture à base de pectine	55
III.3.1. Les milieux de culture	55
III.3.2. Incorporation et solubilisation des pectines dans les milieux de culture	55
III.3.3. Inspections sensorielles du milieu de culture reconstitué	56
III.4. Traitements des données	57
IV. RESULTATS ET INTERPRETATION	59
I. Rendement en pectines extraites	59
II. Incorporation des pectines dans les milieux de culture <i>in vitro</i>	61
II.1. Pectine commerciale	61
II.1.1. Solubilisation	61
II.1.2. Gélification	62
II.2. Pectine d'oranges extraite avec la 2 ^{ème} méthode (P.O ₂)	63
II.2.1. solubilisation	63
II.2.2. gélification	64
II.3. Pectine d'oranges et de pommes extraites avec la 1 ^{ère} méthode (P.O ₁ , P.P ₁)	64
II.3.1. Solubilisation et gélification	64
III. Texture et consistance de la gelée de pectines	70
V. DISCUSSION GENERALE	72
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	77
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
ANNEXE	

Liste des abréviations

AG I : arabinogalactane de type I ;
AG II : arabinogalactane de type II ;
B-Gal: galactosidase ;
DA : Degré d'acétylation ;
DF: Degré ferulique ;
DM : degré de méthylestérification ;
DP : degré de polymérisation ;
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique ;
FOS : fructooligosaccharides ;
G.N : Gélose nutritive ;
Gal : galactose ;
GalA : acide galacturonique ;
Glu : glucose
HG : homogalacturonane ;
HGA : acide homogalacturonique ;
HM pectine hautement méthylestérifiée ;
HPLC : High Performance Liquid Chromatography ;
IR : indice de réfraction ;
LM: faiblement méthylées (Low Méthoxyl) ;
LMA: Low Méthoxyl Amide ;
M : mole ;
M.P : Matière première ;
M.S ss : Milieu de murashige et skoog sans saccharose ;
M.S : Milieu de murashige et skoog ;
Mc : Marcs de pommes ;
MMNO : N-méthylmorpholine-N-oxyde ;
MS : matière sèche ;
NDO: oligosaccharides non digestibles ;
OGA : Les oligogalacturonides ;
Pec : Pectine ;
POS : Les oligosaccharides pectiques ;
RG I : rhamnogalacturonane de type I ;
RG II : rhamnogalacturonane de typeII ;
RG-galacturonohydrolase : rhamnogalacturonane galacturonohydrolase ;
RG-lyase : rhamnogalacturonane lyase ;
RMN : résonance magnétique nucléaire ;
Xyl : xylose ;
Zo : Zeste d'oranges

Liste des figures

Figure 1 : Production mondiale de fruits en 2010 (millions de tonnes) (FAOSTAT., 2012).	05
Figure 2 : Produits obtenus à partir de fruits.....	08
Figure 3 : schéma illustrant la production des sous produits	10
Figure 4 : Diagramme du compostage (Schaub et al., 1996).	13
Figure 5 : Production mondiale de bioéthanol (Crop Energies., 2011).	15
Figure 6 : Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après Sjöström et Westermark (1999)	19
Figure 7 : Vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après Roland (1980)	20
Figure 8 : Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose.	22
Figure 9 : Structure des monolignols et des acides hydroxycinnamiques précurseurs.	24
Figure 10 : Modèle de gélification des pectines HM (Herbstreith et Fox., 1998).	32
Figure 11 : Variations du gel en fonction des pH et des températures (May., 2000).	32
Figure 12 : Représentation schématique de la gélification des pectines LM selon le modèle de la boite à oeuf (Rizzotti., 1994; Ralet et al., 2002; Sharma et al., 2006).	34
Figure 13 : Etapes de formation des gels en présence de Ca+2 (Herbstreith et Fox., 1998).	34
Figure 14 : Structure primaire d'un homogalacturonane (Agnan et al., 2010).	37
Figure 15 : Structure d'un rhamnogalacturonane I. (Agnan et al., 2010).	37
Figure 16 : Structure primaire du rhamnogalacturonane II avec quatre chainesLatérales de structure différente (A-D). (Ridley et al., 2001).	38
Figure 17 : Etapes et conditions d'extraction expérimentale des pectines (Baississe., 2009).	44

Figure 18 : Etapes et conditions d'extraction expérimentale des pectines (Hachem et al., 2015).	52
Figure 19 : Le rendement en pectines de pommes et pectines d'oranges obtenus	60
Figure 20 : Quantité maximale de pectine commerciale incorporée dans les milieux d'essais.	62
Figure 21 : Enregistrement du pH pour la reconstitution de la solution P.O ₁ / P.P ₁ – E.D.	65
Figure 22 : Volume d'HCl et de KOH impliqués dans la reconstitution de la solution pectique (E.D – P.O ₁ / P.P ₁).	66

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des fruits frais (Vierling, 2008).....	07
Tableau 2 : composition chimique moyenne des aliments pour animaux (Pirmohammadi et al., 2006).....	12
Tableau 4 : Principales sources de pectines d'intérêt industriel d'après Thakur et al (1997).	26
Tableau 5 : Teneurs en DM et DAc de certaines pectines.....	30
Tableau 6 : Le rendement en pectines des différents types de M.P et procédés d'extraction.	59
Tableau 7 : Résultats de la solubilisation de la pectine commerciale dans les solutions testées.	61
Tableau 8 : Résultats pour la solubilisation de la pectine P.O ₂ dans les solutions testées.	63
Tableau 9 : Conditions expérimentales pour la solubilisation et la gélification de la solution pectiques (E.D - P.O ₁ / P.P ₁).....	65

Liste des photos

Photo 1 : Solubilisation des pectines.	45
Photo 2 : Purification de l'extrait pectique.	46
Photo 3 : Concentré pectique obtenu à la sortie du rotavapeur.	52
Photo 4 : Reconstitution des milieux de culture à base de pectines.	56
Photo 5 : Pectine complètement solubilisée dans le milieu de culture.	57
Photo 6 : Milieu de culture gélifié par la pectine.	57
Photo 7 : Milieux de cultures reconstitués à base de P.	63
Photo 8 : Gélification expérimentale des milieux de cultures par la pectine extraite.	67
Photo 9 : Milieu M.S gélifié par la P.O ₁ .	69
Photo 10 : Milieu M.S gélifié par la P.P ₁ .	69

Liste des planches

Planche 1 : Les M.P après prétraitements.	44
Planche 2 : Précipitation des pectines avec le sulfate d'aluminium.	47
Planche 3 : La forme finale de la pectine extraite.	49
Planche 4 : Traitements préalables à l'extraction.	51
Planche 5 : Purification, précipitation, et récupération des pectines.	53
Planche 6 : Texture et consistance des milieux de cultures à base de P.O ₂ après addition du saccarose.	64
Planche 7 : Gélification des milieux de culture.	68
Planche 8 : Aspect visuel de la gelée obtenu après gélification.	70

Liste des Annexes

Annexe 1 : Préparation et composition des milieux de cultures.

Introduction

I. INTRODUCTION

La transformation industrielle des fruits donne lieu à une production importante de déchets ayant une incidence sur l'environnement. En région méditerranéenne, le secteur de l'industrie de transformation de ces fruits qui ne cesse de se développer, permet la récupération d'une quantité importante de sous produits potentiellement utilisables soit comme matières premières en d'autres secteurs de l'industrie agroalimentaire soit en alimentation animale ou en pharmacie, ou autres.

Un sous produit issu du processus de fabrication sans être l'objet principal de l'activité, peut d'abord être valorisé comme un co-produit avant d'être considéré comme déchet, certains déchets deviennent alors de véritables matières premières. Parmi les différentes espèces agricoles transformées industriellement, les agrumes et les pommes occupent une place importante, dont La composition chimique a été étudiée par plusieurs auteurs en région méditerranéenne (**Baïssisse., 2009 ; Kumar et al., 2003**). Les déchets issus d'agrumes et des marcs de pommes constituent une matière de choix pour toute une gamme de sous produits, Les composés extractibles (pectines, acide citrique, flavonoides), entre autres (**Baïssisse., 2009 ; Kumar et al., 2003 ; Lanoisellé ., 2007 ; Aubree., 2002**).

L'Algérie compte parmi les importateurs de pectines, malgré qu'elle dispose des ressources fruitières importantes, offrant des possibilités de transformation très larges, aux industries de la filière. Ces industries rejettent annuellement des tonnages énormes de sous produits, qui sur le plan économique, peuvent constituer une source intéressante de produits nobles (pour la récupération des pectines). Yeoh et *al* (2008) rapportent que la demande en pectines sur le marché mondial est au dessus de 30.000 tonnes annuellement et se développe d'environ 4-5 % an (**Baïssisse., 2009**).

Sur le plan écologique, ces sous produits rejetés dans les oueds, les cours d'eau, ou laissés à l'air libre sans aucune valorisation, sont classés parmi les déchets fermentescibles et sources d'une forte pollution microbienne et de produits dont la décomposition biologique est beaucoup plus lente (hémicellulose, cellulose et lignine), d'après Baïssisse (2009). C'est pourquoi, il s'avère judicieux sur le plan économique et environnemental de valoriser ces sous produits en co-produits utilisables en d'autres secteurs de l'industrie agroalimentaires telles que les pectines, ajoute l'auteur.

Ces substances ont fait l'objet de nombreuses recherches portant notamment sur leur caractérisation en tant qu'additifs (Comme agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaisseurs). (**Thakur et al., 1997 ; Mesbahi et al., 2005 ; Diligent., 2010 ; Lanoiselé., 2007 ; Aubree., 2002**).

Dans ce contexte, le présent travail de recherche aborde les aspects suivants :

- la réalisation d'une étude bibliographique pouvant guider le choix des sources végétales.
- la mise au point des procédures expérimentales (protocoles), responsables à la récupération des molécules d'intérêt (pectines), à partir des sous-produits désignés.
- L'exploitation pratique du potentiel hydrocolloïdal des fractions extraites, de leurs propriétés gélifiantes, dans la conception des milieux de culture exemptes d'Agar-agar.

Ce travail n'est qu'une modeste contribution à l'élaboration d'une banque de données ayant pour but, la mise en valeur des substances (sous- produits) de l'alimentation dans la synthèse des milieux de culture in vitro.

*Synthèse
bibliographique*

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. LES FRUITS DANS L'ALIMENTATION HUMAINE

Les fruits représentent un des éléments essentiels pour une alimentation équilibrée et sont connus pour leur rôle dans l'entretien des fonctions vitales de l'organisme humain. La valeur alimentaire, diététique et thérapeutique des fruits est unanimement acceptée. Ils sont souvent considérés comme des « aliments fonctionnels » grâce au contenu riche en divers micronutriments tels que les composés phénoliques (reconnus notamment pour leur fort pouvoir antioxydant), les minéraux, les vitamines etc.

Conformément aux données statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, en 2010, plus de 600 millions de tonnes de fruits ont été obtenues au niveau mondial (Figure 1), dont plus de 67 millions de tonnes en Europe. Parmi les fruits obtenus dans les plus importantes quantités les 5 premières positions sont occupées par les raisins, les pommes, les agrumes, les fruits rouges et les pêches.

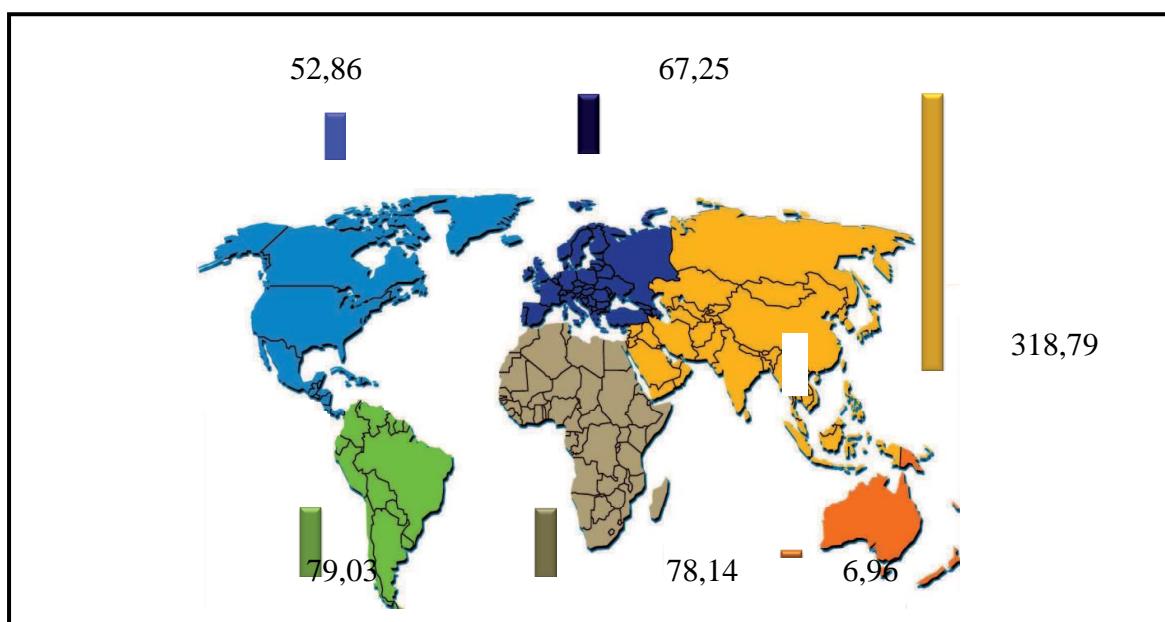


Figure 1. Production mondiale de fruits en 2010 (millions de tonnes) (**FAOSTAT., 2012**).

Même si la production totale des fruits peut satisfaire les besoins de la population (surtout grâce aux multiples échanges commerciaux qui se déroulent entre les producteurs des différentes régions et pays du monde), de nos jours, le défi alimentaire n'est plus seulement d'ordre quantitatif mais aussi d'ordre qualitatif.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré un lien entre la consommation de fruits et l'évolution de diverses maladies. Elles montrent qu'une alimentation riche en fruits peut diminuer le risque d'apparition et améliorer les effets de maladies telles que celles cardio-vasculaires (**Mirmiran et al., 2009 ; Hoekstra et al. 2009 ; Zhu et al., 2011** ; **Soerjomataram et al., 2010**) et cérébraux-vasculaires (**Castaldoet ReedIii., 2008**], le diabète (**Aruoma et al., 2012 ; Fordet al., 2001**), l'ostéoporose (**Keen., 2007 ; Cech., 2012** ; **Lanham-New., 2006**), la cataracte (**Vinson., 2006**), la dégénérescence maculaire (**Ferrari, B 2007**), les différents types de cancers (**Skuladottir et al., 2006 ; Martin-Morenoet al 2008** ; **Collins., 2005, Steinmetz et al 1996**) etc.

Cette évolution explique pourquoi lors de ces dernières années, les chercheurs ont montré un réel intérêt pour l'étude de différents composants de fruits (bénéfiques pour la santé humaine) et notamment pour la compréhension de leur mode d'action afin de mieux connaître les avantages et les éventuels inconvénients conférés par la consommation des fruits sous différentes formes.

I. 2. Valorisation des fruits

I. 2. 1. Fruits frais

Les effets bénéfiques des fruits sur la santé humaine ont été depuis toujours reconnus. A partir de 1988 le programme « 5 a Day » (5 par jour) qui a débuté en Californie et s'est répandue facilement autour du monde, incite la population à consommer minimum 5 fruits quotidiennement.

L'immense diversité des fruits permet une grande variété d'options, le choix des consommateurs étant influencé notamment par les qualités organoleptiques (saveur, arôme, couleur et consistance) mais aussi par la valeur nutritionnelle représentée par la teneur en eau, sucres, acides organiques, lipides, protides et macro ou micronutriments.

Les fruits peuvent être classés dans plusieurs catégories en fonction de différents critères tels que la région géographique de provenance, les aspects botaniques ou la composition.

Ainsi, selon le premier critère mentionné antérieurement nous pouvons distinguer :

- les fruits de région tempérée : pommes, poires, cerises, prunes ;
- les fruits sous tropicaux : figues, agrumes ;
- les fruits tropicaux : ananas, bananes, litchis, mangues.

Du point de vue botanique les fruits peuvent être divisés en plusieurs classes :

- fruits à pépins : pommes, poires, coings ;

- fruits à noyau (drupes) : cerises, prunes, abricots, pêches ;
- baies simples : myrtilles, groseilles, raisins ;
- baies multiloculaires (Hespérides) : agrumes ;
- baies fausses : mûres, framboise ;
- infrutescences : ananas (**Lozano., 2006**).

Selon la teneur en sucres les fruits peuvent être classés comme présenté dans le Tableau.1

Tableau 1. Classification des fruits frais (**Vierling, 2008**).

Classe de fruits	Caractéristiques	Exemples
Fruits acides	- acidité titrable forte - teneur en sucre élevée	- agrumes : oranges, citrons, pamplemousses, mandarines, clémentines - baies acides : groseilles, fraises, framboises, mûres, cassis
Fruits sucrés	- acidité titrable faible - teneur en sucre élevée	- fruits à noyau : prune, pêches, abricots, cerises - fruit à pépins : pommes, poires
Fruits fortement sucrés	- plus de 20% sucres	- raisins, figues, bananes

Vu la grande diversité des fruits et étant donné qu'il est fortement conseillé qu'ils soient consommés surtout frais, un stockage plus ou moins long est nécessaire. Ce stockage dépend des caractéristiques des fruits. Il peut être réalisé, par exemple, sous atmosphère contrôlée (**Thompson., 2010**) ou par traitement avec des radiations gamma ou ultraviolets (**Lacroix., et al 2003**) dans des conditions strictement hygiéniques. Le choix de l'espace de stockage et des méthodes de stockage appropriées est influencé par différents facteurs parmi lesquels nous pouvons citer : la température de stockage, l'humidité relative de l'air de l'espace de stockage, la composition de l'atmosphère, la ventilation, la lumière...etc.

I. 2. 2. Transformation des fruits

Même si la globalisation actuelle du marché assure la disponibilité des fruits frais tout au long de l'année, une importante partie est soumise à différents processus de transformation afin d'obtenir des nouveaux produits satisfaisant les différentes demandes actuelles des consommateurs.

Dans la Figure 2, sont présentés schématiquement les principaux types de produits obtenus à partir de fruits.

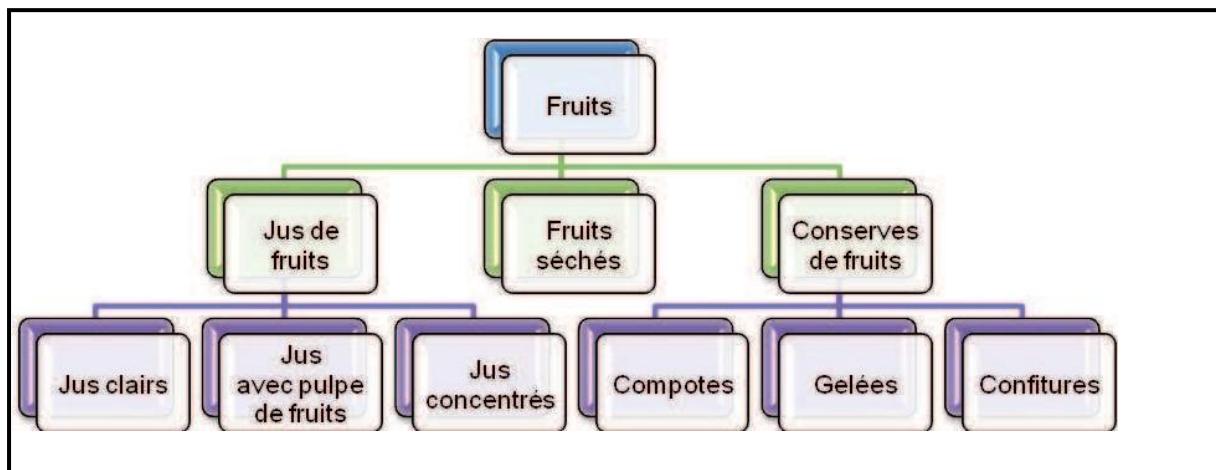


Figure 2 : Produits obtenus à partir de fruits

I.3. Valorisation des sous-produits issus de l'industrie des fruits

La valorisation des fruits sous forme de produits séchés, concentrés, congelés etc. conduit à l'apparition d'une gamme variée de sous-produits et déchets composés notamment de pulpe de fruits, de peaux, de pépins et de queux.

Ces sous-produits sont facilement dégradables. Leur stockage et leur utilisation sont conditionnés par des restrictions légales.

I. 3. 1. Cadre réglementaire lié à l'utilisation de sous-produits de fruits

Vu la grande diversité d'appellations utilisées pour désigner les résidus obtenus après la transformation des fruits et les processus dans lesquels ils sont impliqués il est apparu important de présenter quelques définitions.

Ainsi, conformément à l'article 3 (ci-dessous reporté) de la directive 2008/98/CE du Parlement Européen et du Conseil du 19 novembre 2008 relative aux déchets (**Parlement Européen., 2008**), on entend par:

- **Déchets** : toute substance ou tout objet dont le détenteur se défaît ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire.
- **Bio-déchets** : les déchets biodégradables de jardin ou de parc, les déchets alimentaires ou de cuisine issus des ménages, ainsi que les déchets comparables provenant des usines de transformation de denrées alimentaires.
- **Gestion des déchets** : la collecte, le transport, la valorisation et l'élimination des déchets, y compris la surveillance de ces opérations ainsi que la surveillance des sites de décharge après leur fermeture et notamment les actions menées en tant que négociant ou courtier.
- **Traitemen**t: toute opération de valorisation ou d'élimination, y compris la préparation qui précède la valorisation ou l'élimination.
- **Valorisation** : toute opération dont le résultat principal est que des déchets servent à des fins utiles en remplaçant d'autres matières qui auraient été utilisées à une fin particulière, ou que des déchets soient préparés pour être utilisés à cette fin, dans l'usine ou dans l'ensemble de l'économie.
- **Préparation**: en vue du réemploi, toute opération de contrôle, de nettoyage ou de réparation en vue de la valorisation, par laquelle des produits ou des composants de produits qui sont devenus des déchets sont préparés de manière à être réutilisés sans autre opération de prétraitement.
- **Recyclage**: toute opération de valorisation par laquelle les déchets sont retraités en produits, matières ou substances aux fins de leur fonction initiale ou à d'autres fins. Cela inclut le retraitement des matières organiques, mais n'inclut pas la valorisation énergétique, la conversion pour l'utilisation comme combustible ou pour des opérations de remblayage.
- **Elimination**: toute opération qui n'est pas de la valorisation même lorsque ladite opération a comme conséquence secondaire la récupération de substances ou d'énergie.

Les termes correspondant aux diverses définitions sont représentés de façon schématique dans la Figure 3.

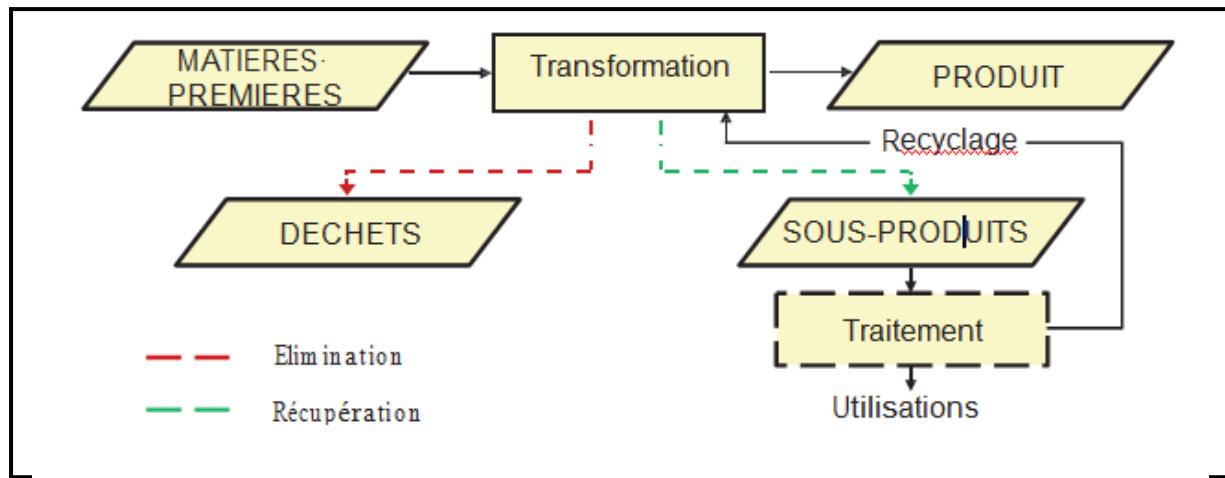


Figure 3 : schéma illustrant la production des sous produits

I. 3. 2. Directions de valorisation de résidus de fruits

Pour répondre aux soucis environnementaux concernant la valorisation de sous-produits, l'industrie de la transformation des fruits est souvent confrontée à plusieurs solutions :

- Alimentation animale :
- elle est la plus ancienne direction d'utilisation des résidus de fruits ;
- le plus souvent elle implique des investissements dans une technologie permettant de fournir un sous-produit sain et de bonne valeur nutritionnelle ;
- il faut toutefois remarquer qu'elle n'élimine pas totalement les rejets dans l'environnement. Elle les diminue mais les reporte sur les déjections animales.
- **Epandage, compostage ;**
- **Production d'énergie** : par incinération ou par production de biogaz (en cogénération, par exemple avec des déjections animales) ;
- **Récupération de différents constituants** incorporables dans de nouveaux produits agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Nous allons voir par la suite quelques exemples d'utilisation des sous-produits issus de la transformation de fruits dans différents domaines.

I. 3. 2. 1. Valorisation dans l'alimentation animale

Les résidus de fruits constituent un produit éminemment instable qui doit être traité rapidement. Le traitement le plus simple est le sur-pressage qui a essentiellement le rôle de diminuer le volume et d'augmenter la densité de la matière par diminution de la quantité de liquide résiduel. Ceci facilite l'ensilage en amenant le taux de matière sèche à 30 – 40% ce qui entraîne aussi la réduction du coût du transport.

En général, la valeur énergétique des résidus de fruits est assez élevée, grâce aux pectines digestibles et aux sucres.

Les ruminants sont les premiers utilisateurs des résidus de fruits frais ou ensilés. Grâce aux microorganismes de leur rumen, ils peuvent utiliser les sous-produits riches en fibres ou contenant certains facteurs antinutritionnels qui ne sont pas supportés par les monogastriques. Compte tenu de l'appétence des animaux, mais aussi des teneurs en acides organiques et en alcool des résidus de fruits, plus ou moins élevées, il est indispensable d'en limiter l'apport quotidien dans une fourchette de 0,5 à 1,1 kg de matière sèche pour 100 kg de poids d'animal vivant. Si l'ensilage est riche en alcool, il peut être parfaitement toléré par les bovins, jusqu'à des doses correspondant à 200 g d'alcool par jour. Afin d'atteindre l'équilibre de la ration des ruminants il est nécessaire d'ajuster les apports complémentaires en matières azotées et minérales (**Moletta., 2009**).

Différentes études ont été réalisées afin de déterminer l'influence des ajouts de résidus de fruits dans l'alimentation animale.

Chez les porcins, les résidus ensilés peuvent être utilisés jusqu'à des quantités correspondant à 15 % de la matière sèche, s'ils ne sont pas trop riches en alcool (risque de cirrhose hépatique). Le plus souvent les résidus de fruits sont incorporés, sous forme sèche, dans un aliment complet. Dans ce cas la proportion est réduite, compte tenu de son prix plus élevé et de la teneur en cellulose (**Moletta., 2009**).

Dans une autre étude (**Pirmohammadi., et al 2006**), la valeur nutritive de résidus de pommes séchés pendant 2 heures à 80°C ou ensilés a été comparée avec celle de l'ensilage de maïs. Une tonne de chaque type de résidus de pommes a été mélangée avec 100 kg de paille humide et 5 kg d'urée. Après stockage dans un tank de 30 tonnes pendant 45 jours, différents paramètres ont été suivis pour chaque mélange (Tableau 2).

Tableau 2 : composition chimique moyenne des aliments pour animaux (**Pirmohammadi et al., 2006**).

	Résidus de pommes séchés	Résidus de pommes ensilés	Maïs ensilé
Matière sèche, g/kg	749	284	429
Matière organique, g/kg MS*	929	925	936
Protéines brutes, g/kg MS	64	72	76
Fibre de détergent acides, g/kg·MS	405	460	260
Fibre de détergent neutre, g/kg·MS	473	567	463
Lignine, g/kg·MS	10	20	44
Azote insoluble en détergent acide, g/kg·MS	5,6	6,5	4,4

*MS – matière sèche

I. 3. 2. 2. Valorisation par épandage et compostage

L'épandage et le compostage reposent sur le recyclage en agriculture des éléments fertilisants contenus dans les effluents ou les produits épandus.

Les plantes cultivées prélèvent des éléments minéraux du sol pour élaborer leurs tissus. Une partie de ces éléments est exportée par la récolte (ou par prélèvement par les animaux d'élevage lors du pâturage). Afin d'éviter toute baisse de fertilité, ces exportations d'éléments minéraux doivent être compensées par des apports minéraux au moins équivalents.

La minéralisation peut s'effectuer sous forme d'apports de minéraux ou à travers des apports de matière organique (**Moletta., 2009**).

Les résidus de fruits peuvent-être utilisés directement comme fertilisants par épandage mais il est nécessaire de remarquer que si cette pratique n'est pas suffisamment contrôlée elle peut entraîner certains risques liés à un excès d'éléments minéraux qui peut provoquer :

- des fortes perturbations de la flore présente ;
- un déséquilibre des minéraux présents dans le sol ;
- une accumulation des minéraux et des métaux lourds dans le sol ;
- des fuites de ces minéraux vers les milieux aqueux.

Par rapport à l'épandage, le compostage est un processus aérobiose qui implique plusieurs étapes (**Figure 4**) au cours desquelles des microorganismes thermophiles (température optimale de développement autour de 50°C) transforment le matériel organique dans un produit stable ressemblant au sol. Le matériel végétal utilisé pour compostage doit être soumis à une étape préliminaire de réduction du contenu d'eau (de 80-90% jusqu'à 50-60%) par pressage ou par séchage naturel. La neutralisation du pH qui est, en général, acide est également nécessaire (**Schaub., et al 1996**).

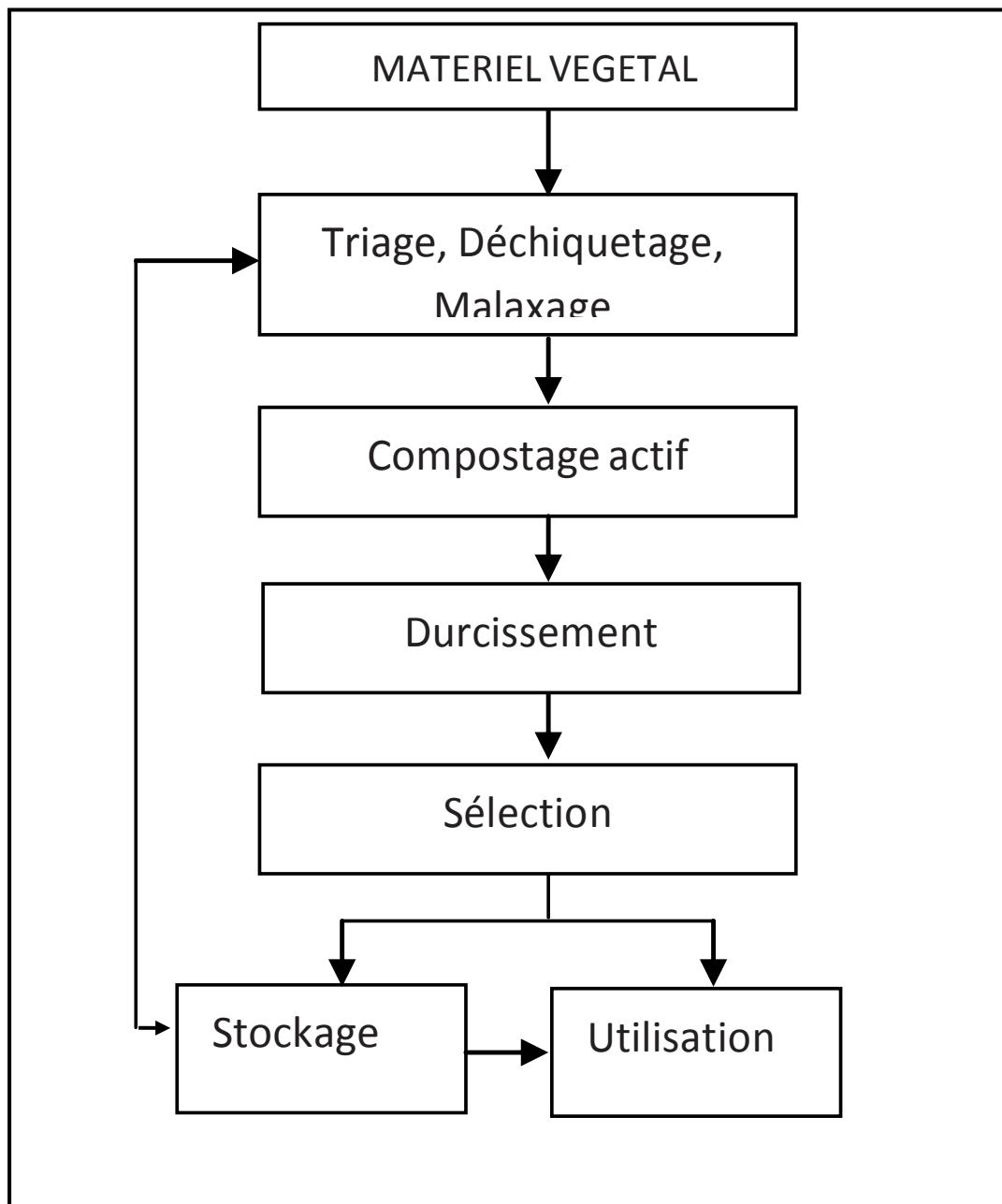


Figure.6. Diagramme d'un

Figure 4 : Diagramme du compostage (Schaub et al., 1996).

לְסִכְתִּים, כֵּן כֵּן.

I. 3. 2. 3. Valorisation sous forme de biomasse et d'agro carburants

- obtention de la biomasse**

Certains types de microorganismes, en particulier, les levures, peuvent utiliser les sucres solubles et les acides organiques pour produire de la biomasse ayant un contenu élevé en protéines. Les levures sont des microorganismes communs qui se développent facilement sur des résidus végétaux (**Stabnikova., et al 2005**).

- Obtention des agro carburants**

La forte industrialisation au niveau mondial a conduit à l'augmentation de la demande de combustibles à base de pétrole. De nos jours 80% des combustibles utilisés sont d'origine fossile et plus de 50% ont comme destination le transport. Les combustibles fossiles sont épuisables et contribuent à l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre ce qui entraîne des effets négatifs incluant les changements climatiques, le recul des glaciers, l'élévation du niveau de la mer, la perte en biodiversité etc. Ces facteurs conduisent à rechercher de nouvelles sources d'énergie alternative (**Nigam et al., 2011**) dont les agro combustibles. Ceux-ci peuvent être classés selon différents critères. Une des classifications existantes les divise en primaires et secondaires. Ceux primaires sont utilisés pour chauffage, pour la production d'électricité alors que ceux secondaires (obtenus par la valorisation de la biomasse e.g. éthanol, biodiesel etc.) peuvent être utilisés dans différents processus industriels et selon les matières premières et la technologie d'obtention se classent en agro combustibles de première, deuxième et troisième génération.

- Obtention du bioéthanol**

Une alternative reconnue pour les combustibles pétroliers est représentée par le bioéthanol dont la production obtenue entre 2005 et 2010 et une estimation de celle pour l'année 2011 sont présentées dans la Figure 5.

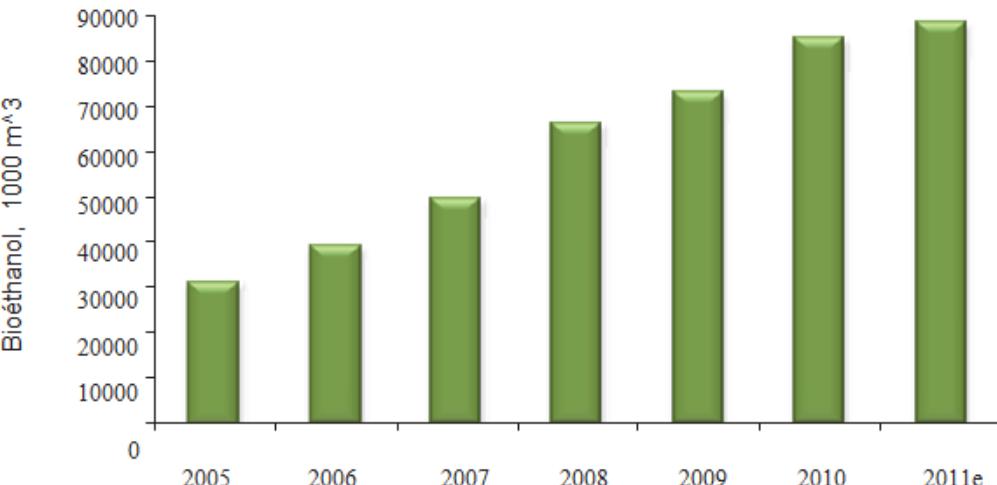


Figure 5 : Production mondiale de bioéthanol (Crop Energies., 2011).

Généralement, le bioéthanol est produit à partir de matières premières telles que celles riches en saccharose (betterave, canne à sucre) ou féculue (blé, maïs, orge) ou à partir de la biomasse lignocellulosique qui est un matériau constitué de macromolécules oxygénées de nature glucidique (bois, pailles, bagasses). Le processus de production implique plusieurs étapes capables d'assurer la transformation des matières premières en bioéthanol dont l'hydrolyse (acide et / ou enzymatique) et la fermentation sont les plus importantes (Balat., et al 2008).

- **Obtention du biogaz**

Plusieurs études ont été réalisées sur la génération du méthane utilisant la fermentation anaérobie des résidus végétaux. L'effet de la température sur la digestion de ces résidus a été exploré dans des conditions psychrophiles (20°C), mésophiles (35°C) et thermophiles (55°C) en réacteurs tubulaires conduisant à un rendement élevé en biogaz. La digestion anaérobie des résidus issus de la transformation des pommes, de l'ananas et de la betterave ont conduit à un rendement de 0,429-0,568 L biogaz / g de charge totale de solide volatil avec un contenu en méthane de 50-60%. La fermentation d'un mélange de résidus d'ananas, de mangues et d'oranges a conduit à 0,6 m³ biogaz / kg charge de solide volatil après une rétention hydraulique de 20 jours. Par digestion anaérobie des résidus végétaux utilisant des réacteurs thermophiles avec liquéfaction en deux étapes et filtre anaérobie mésophile 420 L méthane / kg solide volatil ont été obtenus. Les résultats ont montré qu'à pH 6,5 tant la liquéfaction que l'acidogène thermophile et mésophile ont été maximales dans la production du méthane (Vijayaraghavan., et al 2007).

I. 3. 2. 4. Valorisation dans l'industrie alimentaire

- Obtention de la gelée**

Une valorisation possible des résidus de fruits et notamment de ceux de pommes consiste à utiliser leurs propriétés gélifiantes. **Royer et al., (2006)** ont étudié l'optimisation de la production de la gelée à partir de résidus de pommes (Braeburn, Gala, Golden Delicious, Granny Smith en proportion égales) non traités enzymatiquement et de coings broyés. Ainsi, après l'ajout d'eau (25 mL eau pour 100 g résidus de pommes), le mélange a été cuit pendant 15 minutes. Un sirop de sucre en eau (25 mL eau pour 100 g sucre) a été ajouté ensuite. Une nouvelle période de cuisson à 100°C a été suivie par un séchage à température ambiante pendant 48 heures. La formulation a été réalisée par un plan d'expériences et les résultats obtenus ont révélé que l'utilisation de la combinaison résidus de pommes : coings conduit à une gelée ayant des propriétés sensorielles agréables.

- Obtention de l'huile végétale**

L'huile végétale peut être obtenue par pressage ou par extraction par solvants à partir d'un matériel végétal huileux tel que les pépins des fruits. Ceux-ci doivent être écrasés dans des moulins et ensuite chauffés à la vapeur d'eau jusqu'à une température de 100°C. Le but du chauffage est de faciliter l'élimination ultérieure de l'huile, par la dénaturation et la coagulation partielle des substances protéiques et par la diminution de la viscosité.

L'huile obtenue doit être raffinée. Pour ce faire, dans un premier temps, il est nécessaire de neutraliser l'acidité de l'huile avec de l'hydroxyde ou du carbonate de sodium. Le passage de l'huile sur du charbon actif suivi par un chauffage sous vide et dégazage dans un courant de dioxyde de carbone ou sous un jet de vapeur d'eau assurent la décoloration et la désodorisation.

L'huile raffinée obtenue à partir de pépins de fruits est composée principalement d'acide oléique, d'acide palmitique, d'acide stéarique etc. présente une odeur et un goût agréables et peut-être utilisée dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et alimentaire.

Obtention du vinaigre et de l'alcool alimentaire

Tous les résidus de fruits peuvent-être utilisés pour l'obtention de vinaigre et de l'alcool alimentaire par fermentation à condition d'avoir une teneur minimale de 8% sucres. Les résidus qui ne sont pas valorisés immédiatement peuvent être conservés par séchage ou par fermentation alcoolique avec des levures sélectionnées tout en évitant le contact avec l'air par le remplissage total des bassins de fermentation.

Dans le premier cas l'élimination de l'air se fait par tassage du matériel, les levures étant ajoutées sous forme de culture liquide. La fermentation se déroule pendant 6-7 jours, la conservation étant assurée pendant 2-3 mois. Dans le second cas, la conservation est assurée par l'alcool et par le dioxyde de carbone issu du processus de fermentation des sucres par les levures.

Le résidu obtenu par ce processus peut-être utilisé comme fourrage pour les animaux tel quel ou après séchage dans un séchoir à tambour rotatif (**Cojocaru., et al 1965**).

II.1. Localisation des pectines : la paroi cellulaire végétale

II.1.1. Organisation anatomique et fonctions

Parmi les cellules eucaryotes, la paroi cellulaire est l'une des caractéristiques sanatomiques qui différencie la cellule végétale de la cellule animale. Compartiment original de la structure cellulaire végétale, la paroi est aussi considérée aujourd'hui comme un organite à part entière. Sa composition unique ainsi que l'ensemble des liens physiques et chimiques qui la structure lui permettent d'assurer un véritable continuum à l'interface du symplasme et de l'apoplasm (Mollet., 2006). La paroi cellulaire fournit également à la cellule végétale une résistance mécanique importante et explique souvent sa forme caractéristique. Sa structure varie en fonction des espèces végétales, de l'âge et de la nature des tissus considérés rendant ainsi difficile son étude. C'est une structure rigide micro fibrillaire enrobée d'une matrice hydrosoluble et gélifiante. Différents niveaux d'organisation vont lui conférer son aspect dynamique et rigide. En effet elle doit être modelable au rythme de la croissance chez les jeunes cellules, tout en restant ferme afin d'assurer son rôle de barrière protectrice et de permettre la cohésion des cellules. Elle doit s'opposer aux chocs osmotiques, à la dessiccation, aux rayons ultraviolets, tout en permettant les échanges intercellulaires et le passage des substances nécessaires au métabolisme cellulaire. Ces exigences, à la fois antagonistes et complémentaires, sont à l'origine de la complexité de la paroi cellulaire végétale.

Du point de vue anatomique, certaines caractéristiques permettent de définir un modèle général de la paroi végétale (figures 6 et 7), se décomposant en trois zones distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule :

La lamelle moyenne : partie commune située entre deux cellules voisines dont le rôle est d'assurer la cohésion entre les cellules. Son épaisseur varie de 0,2 à 1 µm. La lamelle moyenne est riche en pectine et dépourvue de cellulose.

La paroi primaire : la plus mince (0,1-0,2 µm), constituent la seule enveloppe fibrillaire des cellules en croissance et montre une grande plasticité. Elle présente une structure biphasique, où les microfibrilles de cellulose sont dispersées dans une matrice amorphe fortement hydratée composée de substances pectiques, d'hémicelluloses et de protéines. La paroi cellulaire primaire est composée de 9-25% de cellulose, de 25-50% d'hémicellulose, 10-35% de pectines et 10% de protéines (Bidlack et al., 1992).

La paroi secondaire : Très épaisse (1 à 5 µm) est ajoutée à la paroi primaire lorsque la cellule a cessé de croître. Elle est constituée d'un réseau fibrillaire de cellulose cristalline et

d'hémicellulose. En fonction de l'orientation des fibrilles de cellulose, trois régions distinctes sont définies (S1, S2, S3). Ces fibrilles de cellulose ont une orientation déterminée qui change rythmiquement et varie d'une strate à l'autre.

La paroi cellulaire végétale est donc formée majoritairement de polysaccharides dont la structure et les relations intermoléculaires peuvent expliquer cinq grandes fonctions (**Perez et al., 2003**) : (1) elle assure l'extension du réseau intercellulaire, (2) elle contribue à l'adhésion des cellules dans le lamelle moyenne, (3) elle limite la porosité de la paroi cellulaire, (4) elle contribue au maintien de l'équilibre physico-chimique du symplaste (eau et ions) et (5) elle assure la transduction de signaux extracellulaires vers le milieu intra-cellulaire au travers de la libération d'oligosaccharides bioactifs. Malgré sa localisation extracellulaire, par delà la membrane plasmique, la paroi cellulaire est aujourd'hui considérée comme un compartiment métabolique dynamique de la cellule la rapprochant ainsi davantage – en référence à la cellule animale – d'une véritable matrice extracellulaire.

Les polysaccharides sont plus accessibles et plus faciles à extraire dans les parois cellulaires peu ou pas lignifiées, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux parois cellulaires non secondarisées.

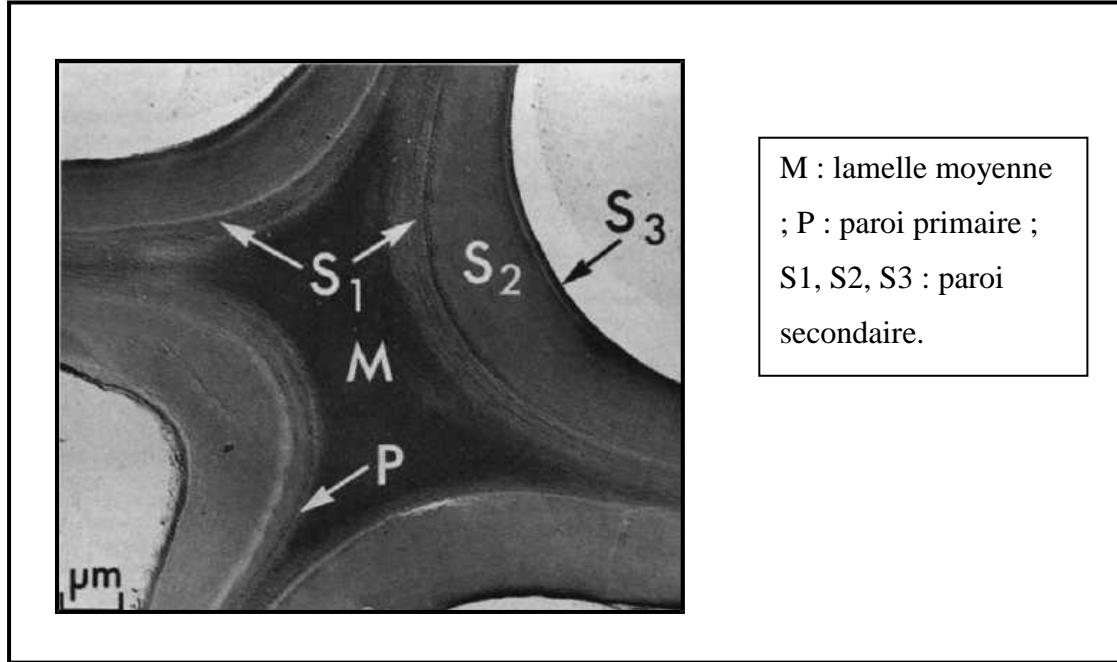


Figure 6 : Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après **Sjöström et Westermark (1999)**.

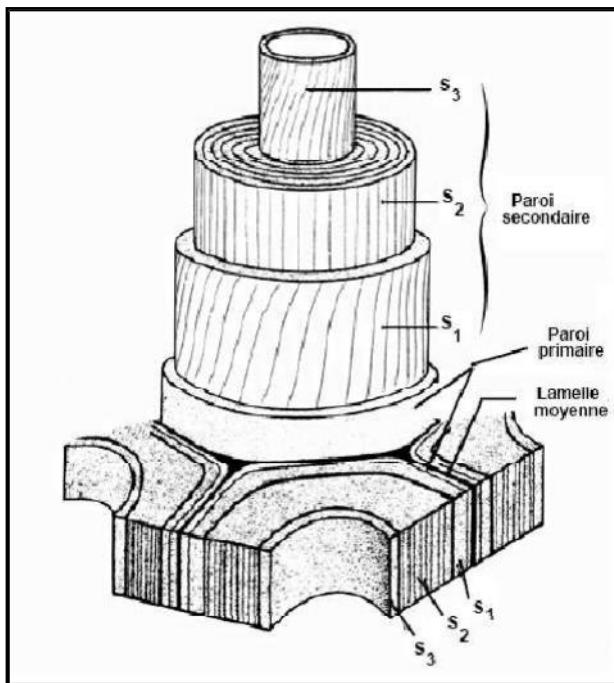


Figure 7 : Vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après **Roland (1980)**.

II.1.2. Les principaux constituants de la paroi végétale

Deux principaux types de polysaccharides entrent dans la composition de la paroi cellulaire :

- **Homogènes** (homopolysaccharides) comportant un seul type de monosaccharide. La nomenclature systématique mentionne : le type de liaison, la configuration anomérique ou, la forme énantiomérique de chaque glucosyl D ou L, le nom de l'unité monosaccharidique, la forme furanosyl et pyranosyl de chaque résidu puis le suffixe -ane. (1-4)-D-pyranoglucan correspond par exemple à la cellulose.
- **Hétérogènes** (hétéropolysaccharides) résultant de la condensation de différents types de monosaccharides. La nomenclature systématique mentionne rarement les configurations anomériques. Le nom est formé des préfixes énantiomériques, des noms des sucres classés par ordre alphabétique, précédant le nom de l'unité monosaccharidique constituant la chaîne principale se terminant par le suffixe -ane. D-xylogalacturonane, la chaîne principale est composée d'acide galacturonique et la chaîne latérale est composée de xylose.

La paroi cellulaire est principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de lignine, et dans une moindre proportion de protéines.

II.1.2.1. La cellulose

Directement issue de la photosynthèse, la cellulose est la molécule organique la plus abondante sur Terre ainsi que le matériau le plus important de la paroi des cellules végétales. La quantité de cellulose biosynthétisée par les plantes terrestres est estimée à 100 milliards de tonnes par an, constituant à elle seule 50% de la masse végétale (**Robert et Roland., 1998**). La molécule de cellulose est un homopolymère linéaire formé par un enchaînement d'unités cellobiose, motif composé de deux D-glucopyranose en conformation 1C4 liés par une liaison glucosidique β -(1→4). Le degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose est compris entre quelques centaines et plusieurs milliers selon sa provenance et sa situation au sein de la paroi cellulaire. La disposition des hydroxyles libres des glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogènes intra-chaînes, stabilisant la molécule dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et de liaisons inter-chaînes qui relient plusieurs molécules de cellulose et les maintiennent disposées parallèlement (figure 8).

Ainsi, l'association de nombreuses molécules de cellulose permet la formation de micro-fibrilles, qui elles-mêmes s'assemblent en fibres et favorisent l'établissement d'un état solide ordonné, cristallin. La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance aux attaques chimiques et enzymatiques, sa grande résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau. La fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et des bases minérales.

La cellulose est peu soluble dans les solvants organiques usuels du fait de son fort degré de cristallinité. Elle peut cependant être solubilisée dans divers systèmes comme les complexes métal/amine (solutions d'hydroxyde de cuprammonium ou cupriéthylènediamine), les oxydes d'amines tertiaires cycliques (N-méthylmorpholine-N-oxyde ou MMNO ; **Johnson., 1969**) ; plus récemment, la cellulose a été solubilisée dans le système chlorure de lithium / N,N-diméthylacétamide(**McCormick et Shen., 1981**).

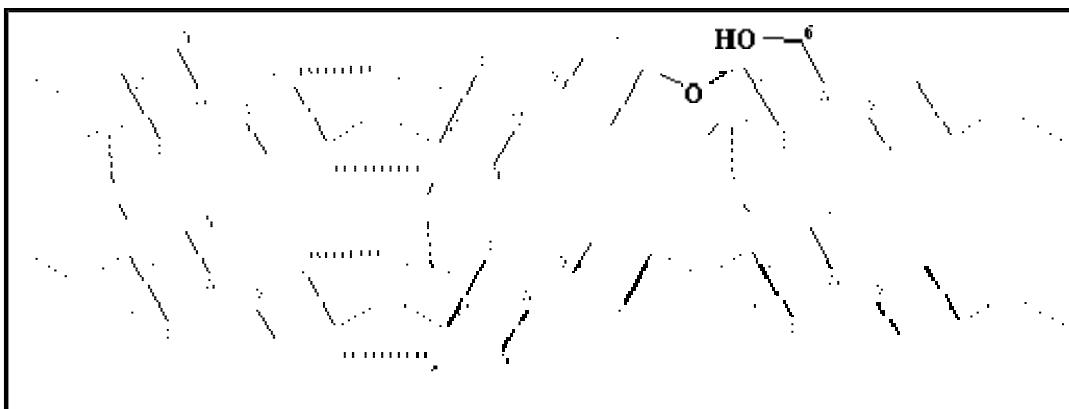


Figure 8 : Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose.

II.1.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Contrairement à la cellulose, elles ne peuvent pas être décrites de façon succincte du fait de leur importante diversité. De plus leur structure dépend de leur origine variétale, du tissu ou du type cellulaire, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Elles diffèrent de la cellulose de par l'hétérogénéité de leur composition monosaccharidique. En général elles sont constituées de chaînes moléculaires plus courtes avec un degré de polymérisation souvent inférieur à 200. A l'origine, les hémicelluloses désignent des polysaccharides pariétaux alcalinosolubles ; cependant certains polysaccharides, tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau. Donc, par extension, les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques, présents dans les parois cellulaires végétales.

A la linéarité et à la monotonie de constitution de la cellulose, s'opposent les multiples façons selon lesquelles s'associent les unités glucidiques dans les hémicelluloses. Elles sont formées d'une chaîne de monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques résultant de la condensation d'un hydroxyle hémiacétalique d'un ose avec un hydroxyle alcoolique d'un autre. Cet enchaînement peut être constitué d'un seul type de monomère (homopolysaccharide) ou de plusieurs types différents (hétéropolysaccharide). Par hydrolyse acide ou enzymatique, les hémicelluloses libèrent des hexoses (glucose, mannose, galactose), des pentoses (xylose, arabinose), des désoxyhexoses (fucose et rhamnose) et des acides uroniques (acide glucuronique et son dérivé 4-O-méthyle, acide galacturonique). Les liaisons qui unissent ces motifs sont elles-mêmes variées. Les hémicelluloses sont constituées par un

axe osidique principal, le suffixe –ane désignant la nature de cet axe ; par exemple, les xyloglucanes sont construits à partir d'une chaîne de glucose, substitué par des unités xylose. Cette chaîne principale peut être ramifiée par des chaînes latérales, qui empêchent le rapprochement des chaînes et donc l'arrangement cristallin.

II.1.2.3. Les pectines

Ce sont les constituants essentiels de la lamelle moyenne à la base du « ciment » qui réunit les cellules entre elles. La structure principale des pectines est formée de chaînes linéaires faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en α -(1→4), appelé acide polygalacturonique, sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Cette zone est aussi qualifiée de lisse (« smoothregion »). Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag. Des chaînes latérales de natures diverses, arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont aussi greffées sur le squelette rhamnogalacturonique, d'où la grande diversité de ces polymères. Cette structure ramifiée est aussi appelée zone chevelue (« hairyregion »). Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupements méthyles ou salifiées par des ions monovalents ou divalents tels que K+, Na+ et Ca2+.

La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, de la présence de chaînes latérales, mais aussi et surtout du degré de méthylestérification et de la distribution de ces groupements méthyles. Les pectines sont classées suivant leur mode d'extraction, soit à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, soit par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).

II.1.2.4. Les lignines

Les lignines sont des polyphénols, macromolécules tridimensionnelles hydrophobes de haut poids moléculaire. Leur structure résulte de la copolymérisation de trois monomères aromatiques de type phénylpropène : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, que l'on désigne sous le terme général de monolignols (figure 9), leurs précurseurs, les acides hydroxycinnamiques (ou alcools phénylpropénoïques), sont produits au niveau du réticulum endoplasmique des cellules en voie de lignification, à partir de la phénylalanine, désaminée en cinnamate, hydroxylée, méthylée et réduite en alcool au niveau de la fonction carboxyle. Au niveau de la paroi

cellulaire, les monolignols sont oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et peroxydases) ; ces radicaux polymérisent, plus ou moins au hasard et sans intervention enzymatique, ce qui explique la variabilité importante dans la structure des lignines. Cette polymérisation *in situ* s'accompagne de la formation de liaisons covalentes avec les glycanes de la paroi. A la fin du développement cellulaire la lignine incruste ainsi la cellulose et les hémicelluloses, ce qui assure la rigidité de la paroi, mais pose des problèmes lors de l'extraction des hémicelluloses.

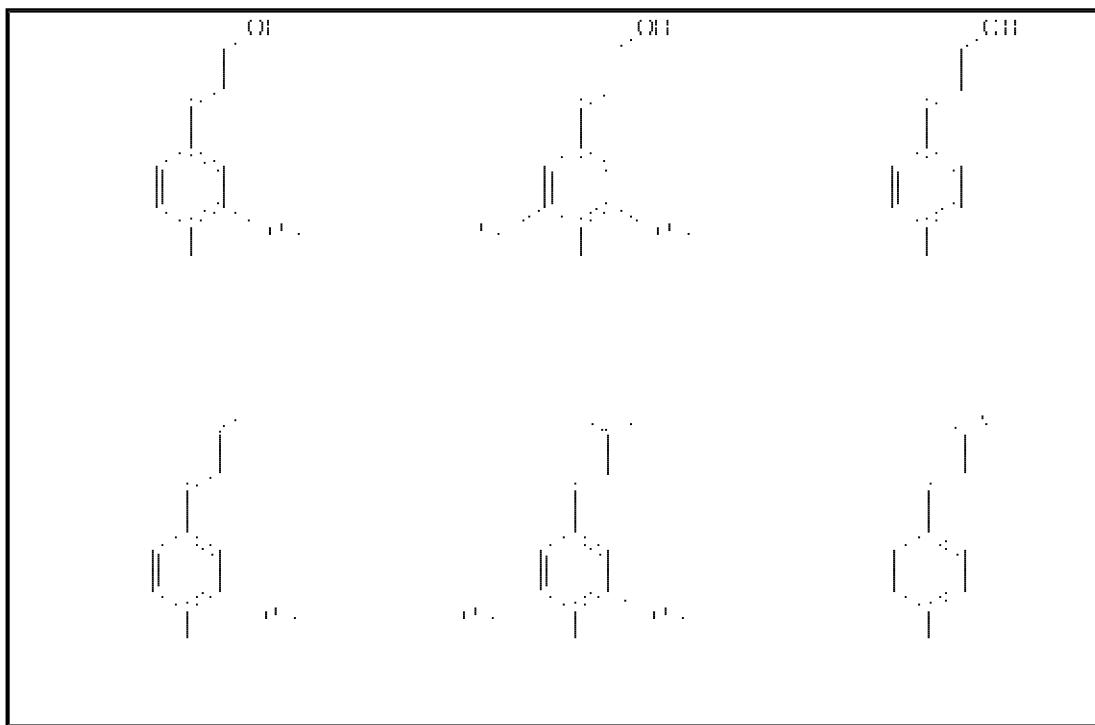


Figure 9 : Structure des monolignols et des acides hydroxycinnamiques précurseurs.

La proportion des trois monomères et les liaisons intramoléculaires sont très variables, dépendantes de l'origine botanique, du tissu et de la localisation dans la paroi. Les lignines sont difficilement dégradées, très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques ; seuls certaines bactéries et champignons, comme les polypores, sont capables d'assurer la lignolyse. Elles sont très réactives, parce qu'elles contiennent entre autres des fonctions phénoliques et hydroxyles, et sont insolubles dans les solvants du fait qu'elles constituent un réseau infini. Pour caractériser les lignines, des méthodes de dégradation douces ont été mises au point, qui permettent de dépolymériser le réseau tridimensionnel du polymère sans dégrader ni les noyaux aromatiques, ni la chaîne propane. Cependant, du fait

des opérations d'extraction, les lignines isolées (lignines d'extraction) sont différentes des lignines in situ (protolignines). Le terme de « klason lignine » est parfois employé et correspond au résidu après avoir débarrassé la paroi des extractibles hydrophiles et lipophiles, et des polysaccharides par de l'acide sulfurique fort.

II.1.2.5. Les autres constituants

En marge de ses constituants polysaccharidiques principaux, la paroi comporte d'autres catégories de polysaccharides. C'est notamment le cas de la callose, un -(1,3)-glucane(**Aspinall et Kessler., 1957**). Cette dernière est souvent détectée en réponse à des blessures ou des infections par des pathogènes. Par ailleurs, les arabinogalactanes protéines (AGP) peuvent être extraits d'un grand nombre de tissus. Elles sont composées de 10% de protéines riches en hydroxyproline, serine, alanine et glycine et de 90% de polysaccharides composés essentiellement d'Ara, Gal, Rha, Man, Gal A, Glc A (**Tucker et Mitchell., 1993**).

La paroi ne contient pas que des polysaccharides. Les substrats lignocellulosiques renferment également des lipides, des protéines ainsi que des substances de faible poids moléculaire, tels que les extraits et minéraux, spécifiques à chaque espèce végétale. La paroi contient généralement entre 3 et 6% de protéines, souvent sous forme de glycoprotéines, dont les extensines. Les autres sont des enzymes telles que la peroxydase ou diverses glycosidases.

II.2. Les pectines : une classe de polysaccharide pariétal typique des végétaux

II.2.1. Sources de pectines à usages industriels

Même si les pectines sont très largement répandues dans les tissus végétaux où elles sont un ciment intercellulaire dans la lamelle moyenne et un liant intermoléculaire dans la paroi primaire, le nombre de sources naturelles qui peuvent être utilisées pour des usages industriels est limité. Les propriétés physico-chimiques des pectines - base de leur utilisation industrielle-dépendent très largement de leurs caractéristiques structurales qui elles-mêmes sont expliquées par la plante qui est à l'origine de leurs synthèses. C'est pourquoi, la détection de grandes quantités de pectines dans une source végétale n'est pas un argument suffisant pour que ces dernières puissent être valorisées à une échelle industrielle. Le cas des pectines de betteraves dont l'acétylation des fonctions alcools secondaires des acides galacturoniques s'oppose à la gélification en est une parfaite illustration. Le tableau 3, précise les sources actuelles de pectines commerciales.

Tableau 3 : Principales sources de pectines d'intérêt industriel d'après Thakur et al (1997).

Fruits	% de pectines (%massique)
Pomme (<i>Malus spp.</i>)	0.5-1.6
Marc de pomme	1.5-2.5
Banane (<i>Musa acuminata L.</i>)	0.7-1.2
Pulpe de betterave (<i>Beta vulgaris L.</i>)	1.0
Carambole (<i>Averrhoa carambola L.</i>)	0.66
Carotte (<i>Daucus carota L.</i>)	0.2-0.5
Goyave (<i>Psidiumguajava L.</i>)	0.77-0.99
Pulpe de citron (<i>Citrus lemon L.</i>)	2.5-4.0
Litchi (<i>Litchi chinesis S.</i>)	0.42
Mangue (<i>Mangiferaindica L.</i>)	0.26-0.42
Zeste d'orange (<i>Citrus sinesis</i>)	3.5-5.5
Papaye (<i>Carciapapaya</i>)	0.66-1.0
Fruit de la passion (<i>Passifloraedulis S.</i>)	0.5
Péricarpe de fruit de la passion	2.1-3.0
Pêches (<i>Prunus persica</i>)	0.1-0.9
Ananas (<i>Ananas sosmosus L.</i>)	0.04-0.13
Fraise (<i>Fragariaananassa</i>)	0.6-0.7
Tamarin (<i>Tamarindusindica L.</i>)	1.71
Mûre (<i>Rubus rosafolius</i>)	0.72
Tomate (<i>Lycopersiconesculentum</i>)	0.2-0.6

II.3. Propriétés chimiques des pectines

II.3.1. Solubilité des pectines :

Les pectines se comportent comme des poly-électrolytes grâce à la présence de groupements carboxyliques dans leur squelette (**Lopes da Silva et Roa., 2006; Ralet et al., 2002; Thibault et al., 2000**).

Selon Lopes da Silva et Roa, (2006), la solubilité est déterminée par le P_{Ka} qui varie dans une gamme de valeurs constantes (2,9 - 3,2). La solubilité des pectines dépend de divers paramètres dont entre autres :

- Le solvant, sa nature et sa force ionique.
- La nature de la pectine et sa concentration.
- Le pH de la solution.
- La température de la solution.
- Les contre-ions d'autres polymères existants dans la solution.
- Le degré depolymérisation.
- L'ionisation des groupements carboxyles et leur distribution.

Selon Lopes da Silva et Roa (2006), il faut ajouter à ceux-la : le degré d'amidation qui entraîne une forte rigidité des macromolécules. Celle-ci est la conséquence d'une individualisation, des molécules pectiques, favorisée par la dissociation des fonctions acides carboxyliques en C-6, des résidus d'acides galacturonique et leur stabilisation par répulsion électrostatique (**Fishman et al., 1993 cités par Yapo, 2007**).

Par conséquent, tout solvant susceptible de favoriser la dissociation se présente comme un bon agent de solubilisation des pectines.

En général les pectines sont solubles en milieux aqueux (eau, solutions tampons à faible force ionique) comme le formamide, le dimethyl-formamide, et le glycérol. (**Voragen et al., 1996 cités par Visser et Voragen., 1996**).

Dans un milieu aqueux il se produit d'abord un gonflement des chaînes, puis celles-ci s'individualisent et la solubilisation proprement dite a lieu. Ce processus se traduit par une augmentation de la viscosité du milieu.

A noter, les propriétés poly-électrolytiques des pectines influencent énormément son utilisation comme ingrédient dans l'aliment.

II.3.2. Stabilité des pectines :

La stabilité maximale des pectines a lieu à pH 4 **Sriamornsak, 2003; Voragen et al., 1996 cités par Visser et Voragen., 1996**. Pour des pH < 3 et à basse température, les groupements acétyles et méthyles sont déstabilisés et les sucres neutres sont hydroxylés. Si la température est élevée l'hydrolyse est accélérée (**Sriamornsak., 2003**) .En milieu alcalin et à basse température les groupements estéres sont saponifiés. En milieu neutre et à température ambiante la saponification est accompagnée de la réaction de dépolymérisation, cette dégradation à lieu uniquement dans les liaisons glycosides et dans les résidus méthylés de l'acide galacturonique. A des températures > 60° C, cette dégradation à lieu qu'à pH légèrement acide (pH proche de 5) (**Voragen et al., 1996 cités par Visser et Voragen, 1996**).

II.3.3. Groupements fonctionnels des pectines :

II.3.3.1. Degré de méthylation :

Les pectines commerciales hautement méthylées présentent un degré de 60 à 70 % et les pectines faiblement méthylées présentent un degré variant entre 20 à 40 % (**Sriamornsak., 2003**). Pour cette raison on définit le DM comme étant le nombre de fonctions acides estérifiées pour 100 monomères d'acides galacturonique. Ainsi deux familles de pectines sont distinguées:

- Pectines hautement méthylées ou HM (high méthoxy) qui possède un DM > 50 %.
- Pectines faiblement méthylées ou LM (lowméthoxy) qui possède un DM < 50%.

Le substituant méthanol joue un rôle majeur dans les propriétés physiques des pectines (**Guillotin., 2005**). La répartition des groupements méthyles, le long de la chaîne principale joue un rôle important dans les processus de gélification, elle peut être regroupée ou aléatoire. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la teneur en méthanol des pectines :

- Méthode titrimétrique Food (**Chemical Codex., 1981**).
- Méthode spectrométrique IR (**Gnanasambandam et Proctor., 2000; Haas et Jager., 1986, cités par Guillotin., 2005**).
- Méthode par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) **Grasdalen et al.,1988, cités par Guillotin, 2005; Bedouet et al., 2003; Dennapa et al., 2006**.
- Méthode colorimétrique après oxydation chimique ou enzymatique en formaldéhyde (**Thibault al., 2000**).

D'autres méthodes sont également utilisées :

Après saponification, par chromatographie en phase gazeuse, par chromatographie liquide haute pression (**Levigne et al., 2002**).

La détermination du DM se fait aussi par électrophorèse **capillaire Jiang et al., 2002; Jiang et al., 2001; Zhong et al., 1998, cités par Guillotin, 2005**.

Chez certaines pectines LM, les fonctions acides sont neutralisées par de l'ammoniac(NH₃) et forment une fonction amide ce sont les pectines amides ou pectines LMA.

Les acides galacturoniqueamidés peuvent être dosés en déterminant l'ammoniac libéré après distillation alcaline ou par une des variantes des méthodes de dosage d'azote total.

II.3.3.2. Degré d'acétylation (DAc):

Il est défini comme le pourcentage de résidus galacturosyles estérifiés par un groupement acétyle. Ces groupements se localisent généralement au niveau des résidus rhamnogalacturonanes(**Sharma et al., 2006**).

L'acide acétique est également dosé après saponification par chromatographie en phase gazeuse, par chromatographie liquide haute pression ou par des méthodes enzymatiques, ou encore par titrimétrie après distillation (**Thibault et al., 2000; Levigne et al., 2002**), ou par spectrométrie RMN (**Bedouet, 2003**).

Les teneurs de DM et de Dac diffèrent d'une pectine à une autre selon leur origine et les conditions de leur extraction. Les pectines de pommes et d'agrumes sont théoriquement riches en groupements méthyles et pauvres en groupements acétyles, alors que celles d'abricots et de betteraves sont riches en groupements acétyles (tableau 5).

II.3.3.3. Degré ferulique (DF) :

L'acide ferulique peut être dosé sous forme ester ou libre par spectrophotométrie et sous forme libre, par chromatographie liquide haute pression ou après dérivation par chromatographie.

III.4. Propriétés fonctionnelles des pectines :

III.4.1. Propriétés gélifiantes des pectines :

En industrie alimentaire les pectines commerciales sont un additif alimentaire, dont le code est : **E440**. La principale caractéristique physicochimique recherchée est leur pouvoir de gélification. Les gels de pectines sont des gels physiques formés par association locale entre les chaînes macromoléculaires au niveau des zones de jonctions.

Tableau 5 : Teneurs en DM et DAc de certaines pectines.

ORIGINE DES PECTINES	DM	DAC	METHODES	REFERENCES
Pommes	73	5	HPLC	Thomas et Thibault (2002)
Pommes	72.8	62.3	HPLC	Constenla et al. (2002)
Pommes	68	-	HPLC	Ralet et al. (2001)
Citrons	80.5 71	32.3 -	Spectrométrie RMN	Bedouet et al. (2003)
Fraises	50	58	HPLC	Levigne et al. (2002)
Fraises	88	-	HPLC	Fishman et al. (2006)
Betteraves	65.6	29.2	HPLC	Yapo et al. (2006)

La nature exacte de la zone de jonction dépend de la structure chimique des pectines et doit être d'une longueur minimale pour être stable compte tenu des caractéristiques du milieu auxquels s'ajoutent les facteurs intrinsèques (masse moléculaire, charge, degré de substitution, teneur en acides galacturonique) et extrinsèques (température, pH, force ionique, nature des ions dans le milieu) (**Plaschina et al., 1978; Ravanat et Rindaouo., 1980; Rolin, 2002 cités par Guillotin., 2005**).

Les gels se forment en plusieurs étapes durant le refroidissement. Tout d'abord les molécules de pectines se réunissent en fibrilles puis celles-ci se rassemblent en paquets, ces derniers s'agrémentent en réseau; D'autres molécules de pectines viennent s'associer au réseau formé.

II.4.1.1. Gélification des pectines hautement méthylées (HM) :

Ces pectines à DM variant entre 53 à 77 %, forment des gels irréversibles en milieu acide pH (2 à 3.8) et en présence de solubles de types polyols, et particulièrement le saccharose glucose et fructose à des teneurs > 60 % (**May., 2000; Thibault et al., 2000 ; Multon., 2002; Guillotin., 2005**), à cela s'ajoute l'activité de l'eau (aw) faible Dea,1989 et la température (**May, 2000**) (figures 10 et 11).

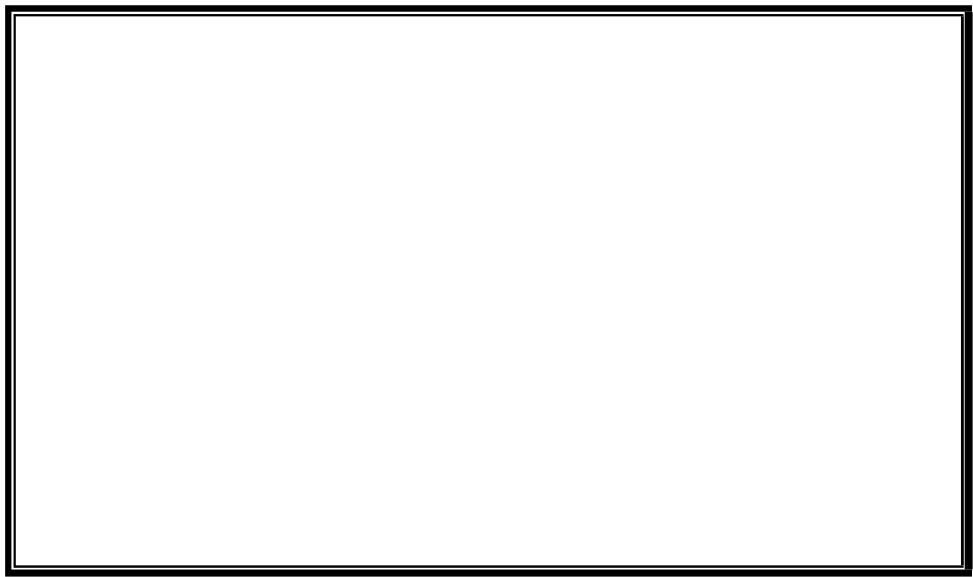
La gélification résulte de la formation de zone de jonction entre les régions homogalacturoniques (HG) des molécules pectiques, sous l'action du sucre qui favorise la diminution de l'activité de l'eau (aw) et de l'acide qui réduit les répulsions électrostatiques intermoléculaires (**Thibault et al., 2000; Multon 2002; Herbstreith et Fox ,1998(a) ; Sharma et al., 2006**).

La stabilité de ces zones de jonctions serait assurée par la combinaison de liaisons de type hydrogène et des interactions hydrophobes entre groupement méthyles.

Le rhamnose et les chaînes latérales limitent l'extension de ces zones de jonction et assurent ainsi la formation d'un réseau tridimensionnel cohérent.

Selon Sharma et al., (2006), le processus de gélification et la force des gels obtenus vont dépendre des caractéristiques moléculaires :

- Une masse moléculaire élevée permettra la formation de gel de force supérieure.



• **Figure 10** : Modèle de gélification des pectines HM (**Herbstreith et Fox., 1998**).

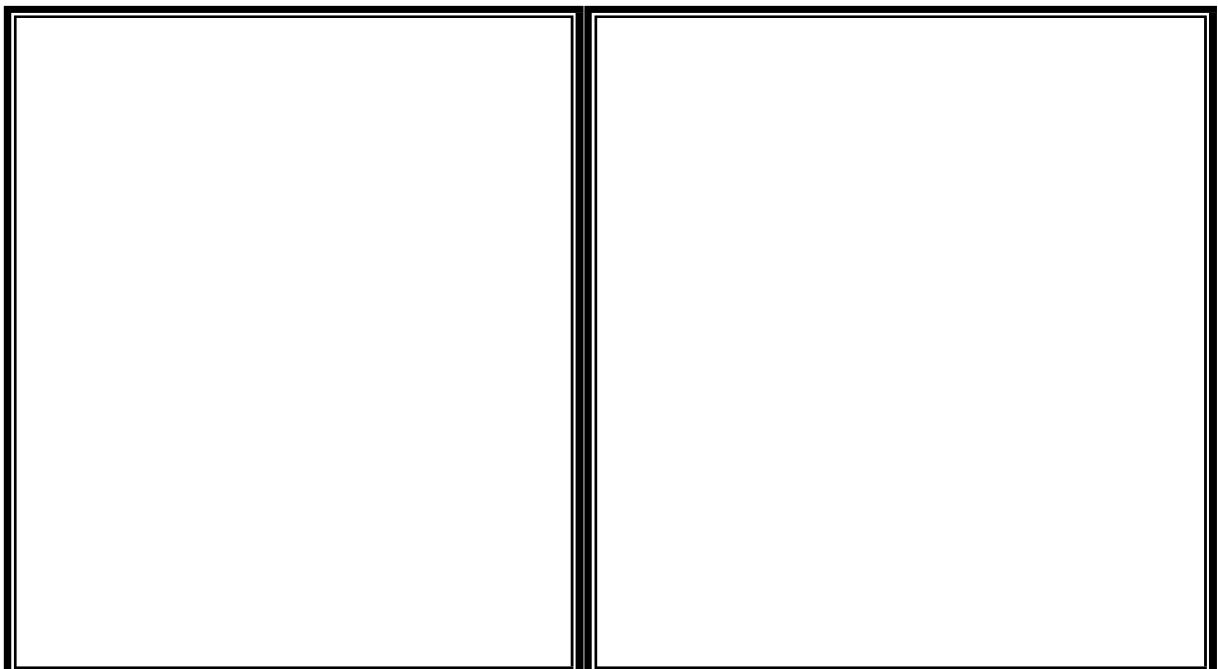


Figure 11 : Variations du gel en fonction des pH et des températures (**May., 2000**).

- Le temps de gélification augmente avec la diminution du DM. Plus le DM est élevé moins il faut acidifier le milieu. · Les groupements acétyles et les chaînes latérales d'oses neutres ont des effets négatifs sur la formation du gel.

II.4.1.2. Gélification des pectines faiblement méthylées (LM)

Les pectines LM ont un champ d'application plus vaste que les pectines HM. Ces pectines de faibles DM forment des gels alimentaires thermoréversibles en présence des ions divalents, en l'occurrence le cation Ca++, le seul utilisé en industrie alimentaire (**Yapo., 2007**), mais dans une gamme de pH plus large de 2,8 à 7 (**Guillotin., 2005**).

La gélification est due à la formation des zones de jonction entre les régions HG des deux chaînes pectiques via des ponts Ca++(**Sriamornsak., 2003; Sharma et al., 2006**) en formant de cavités qui permettent l'association des chaînes de pectines par la chélation des ions de calcium, formant un réseau moléculaire sous la forme de "boîte à œufs " par analogie aux alginates (**Rizzotti., 1994; Charles et Guy., 1997; Grant et al., 1973 cités par Sriamornsak., 2003**)(figure 13).

La gélification du système se ferait en deux temps (figure 12) :

Une dimérisation des chaînes polymériques et une agrégation des dimères formés qui a lieu pour former le réseau gélifié avec une forte contribution des forces de Vander Waals et des liaisons hydrogène. Contrairement à un gel de pectine HM, le gel de pectine LM est thermoréversible (**Rolin et De Vries., 1990 cités par Guillotin., 2005**), et présente parfois une thixotropie (transition gel-sol ou sol -gel) très marquée (**Goycoolea et Cardenas., 2003; Lopes da Silva et Rao., 2006; Yapo., 2007**).

Divers facteurs extrinsèques peuvent affecter la formation du gel et /ou sa texture:

La vitesse et la force (fermeté) du gel augmentent avec l'augmentation de la concentration en Ca. La concentration nécessaire en cet ion est de l'ordre de 1 à 10mM (**Yapo et Koffi., 2006**). Le pH influence également la nature du gel : à pH 2, les fonctions acides carboxyliques libres ne se dissocient que faiblement, ce qui réduit les associations inter chaînes via les ions Ca++, au bénéfice des liaisons hydrogènes, ainsi le gel formé est plus ou moins rigide et par conséquent peu thermoréversible.



Figure 12 : Représentation schématique de la gélification des pectines LM selon le modèle de la boîte à oeuf (**Rizzotti., 1994; Ralet et al., 2002; Sharma et al., 2006**).

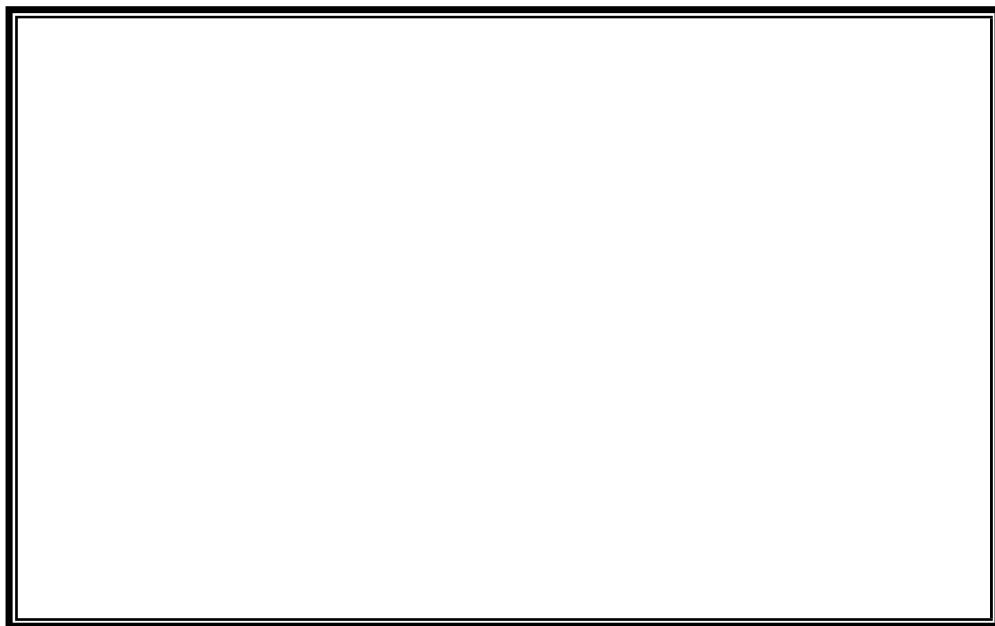


Figure 13 : Etapes de formation des gels en présence de Ca^{++}
(Herbstreith et Fox., 1998).

En revanche à pH > 3, un phénomène inverse se produit et le gel formé est tendre, ferme et thermoréversible. Les gels de pectines LM sont très sensibles à un certain nombre de facteurs intrinsèques, notamment le DM, la nature, la quantité et la distribution des substituants méthyle et acétyle le long des résidus HG ainsi que la masse moléculaire. Plus le DM est faible, plus l'affinité des ions Ca⁺⁺ pour les chaînes pectiques est grande, donnant ainsi des gels plus rigides. Plus la masse moléculaire est grande plus les gels formés sont rigides. L'acétylation réduit l'affinité de la pectine LM pour les ions Ca⁺⁺ (**Souty et al., 1981; Thibault et al., 2000; Sharma et al., 2006**).

II.5. Structures chimiques fines des pectines

II.5.1. Les différents domaines pectiques

Les pectines sont des hétéropolysaccharides caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique (GalA), monomères liés entre eux par des liaisons α -(1-4) et partiellement acétylés ou estérifiés par des groupements méthyles. Elles sont composées de différents domaines pectiques de quelques végétaux (**Thakur et al., 1997**). Polysaccharides associés : les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes,

Les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes. Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts, à savoir l'homogalacturonane et les rhamnogalacturonanes I et II (RG-I et RG-II) (**Perrone et al., 2002**).

II.5.2. Homogalacturonane

Les homogalacturonanes représentent 57 à 69 % de la pectine (**Jackson et al., 2007**). Ce sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturonique reliés entre eux par des liaisons α -(1-4) et dont les fonctions carboxyliques et alcools peuvent être estérifiées respectivement par du méthanol en position C6 et par l'acide acétique en position C2 ou C3. Elles forment la zone lisse des pectines. La méthylestérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application Industrielle des pectines et leur capacité d'interaction (**Rale et al., 2005**). En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre régions homogalacturonanes (**Ridley et al., 2001**).

II.5.3. rhamnogalacturonane type I

Le RG-I est une famille de polysaccharides pectiques qui représente 7 à 14 % de la pectine et environ 20 à 80 % des rhamnoses du RG-I sont substitués (**Ridley et al., 2001 ; Jackson et al., 2007**). Le RG-I d'un degré de polymérisation (DP) d'environ 1000 est constitué d'une alternance d'unités rhamnosiques et d'unités galacturoniques [$\rightarrow 4$]- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow]. Comme dans l'homogalacturonane, certains résidus d'acide galacturonique de RG-I sont acétylés (**Dumville et al., 2000 ; Perrone et al., 2002**). Différents substituants polysaccharidiques neutres sont capables de se greffer à ce squelette osidique au niveau du carbone C4 du L-rhamnose (Figure 15). Parmi ces substituants, on peut citer le L-arabinose, le D-galactose, les arabinanes, les galactanes ou les arabinogalactanes (**Bonnin et al., 2002**). Chez certains Végétaux (betterave, épinard, etc.), les chaînes latérales peuvent être substituées par des acides phénoliques (acide férulique ou coumarique) estérifiant les fonctions alcool en position 6 des résidus de galactose ou en position 2 des résidus d'arabinose (**Bonnin et al., 2002**).

II.5.4. rhamnogalacturonane type II

Le RG-II est un galacturonane substitué qui représente 10 à 11 % de la pectine et dont la structure complexe est très conservée au sein des espèces végétales (**Jackson et al., 2007**). Avec un DP d'environ 60 (**Dumville et al., 2000**), le RG-II comprend au moins Huit résidus d'acides galacturoniques liés en 1-4 constituant la chaîne principale, sur laquelle sont greffés quatre complexes glycosidiques différents (Figure 16). Ces complexes glycosidiques sont composés d'arabinofuranose, d'arabinopyranose, de glucopyranose, de fucopyranose, d'apiofuranose et de galactopyranose et d'autres sucres inhabituels tels que le Dha : acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique, le Kdo : acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique et l'acide acérique. Il contient également des sucres méthylosés rarement observés comme le 2-O-méthylxylose et le 2-O-méthylfucose (**Ridley et al., 2001**). Le RG-II se présente principalement sous la forme d'un dimère dans la paroi cellulaire des plantes par l'établissement de liaison covalente de diester de bore. Cette liaison est formée entre le OH-2 et le OH-3 des résidus β -D-apiofuranose de chaque sous-unité monomérique de RG-II. En outre, il a été montré que seul le résidu apiofuranose de chaque chaîne latérale A participe à cette dimérisation (**Ishii et al., 1999 ; Ridley et al., 2001**).

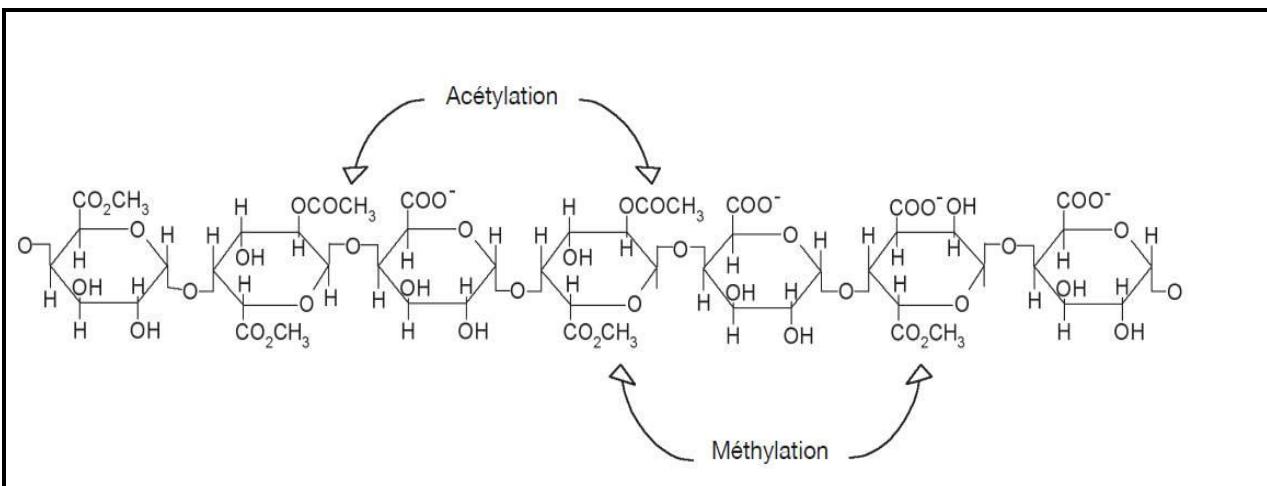


Figure 14 : Structure primaire d'un homogalacturonane (Agnan et al., 2010).

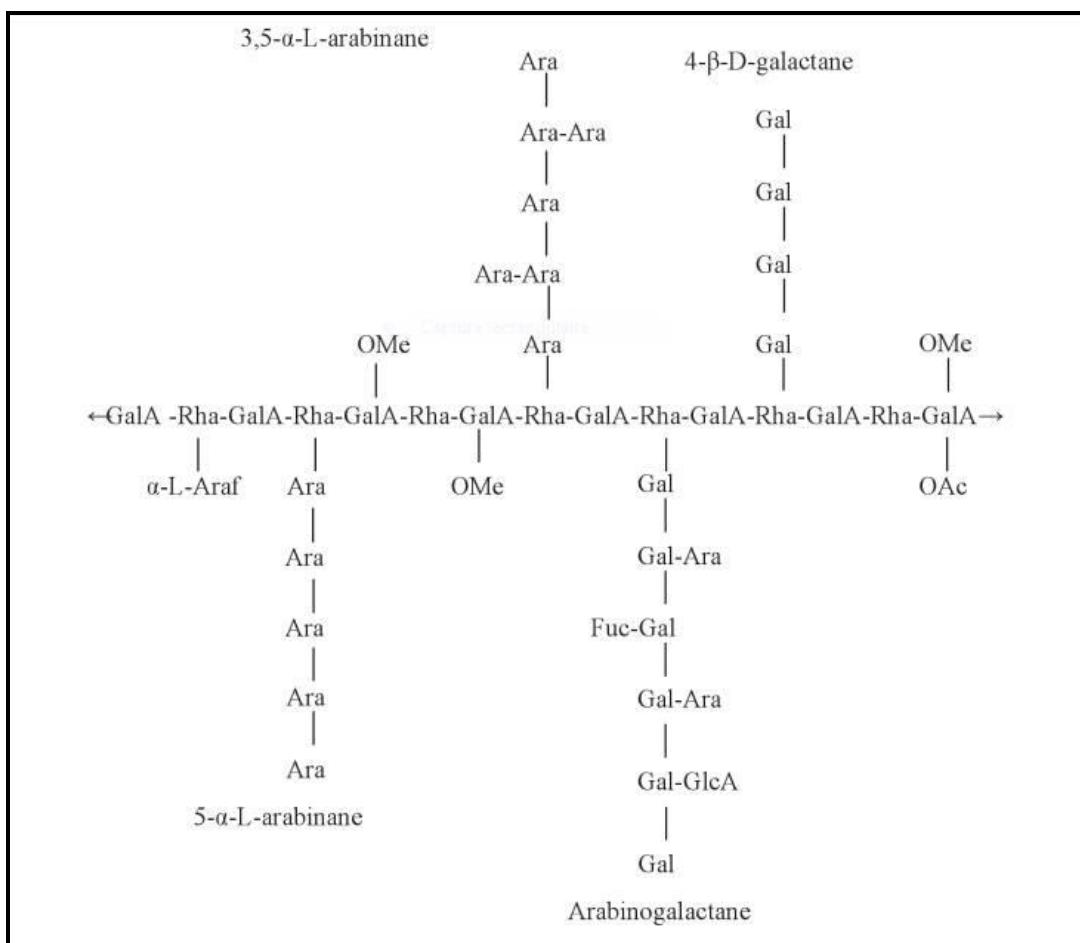


Figure 15 : Structure d'un rhamnogalacturonane I. (Agnan et al., 2010).

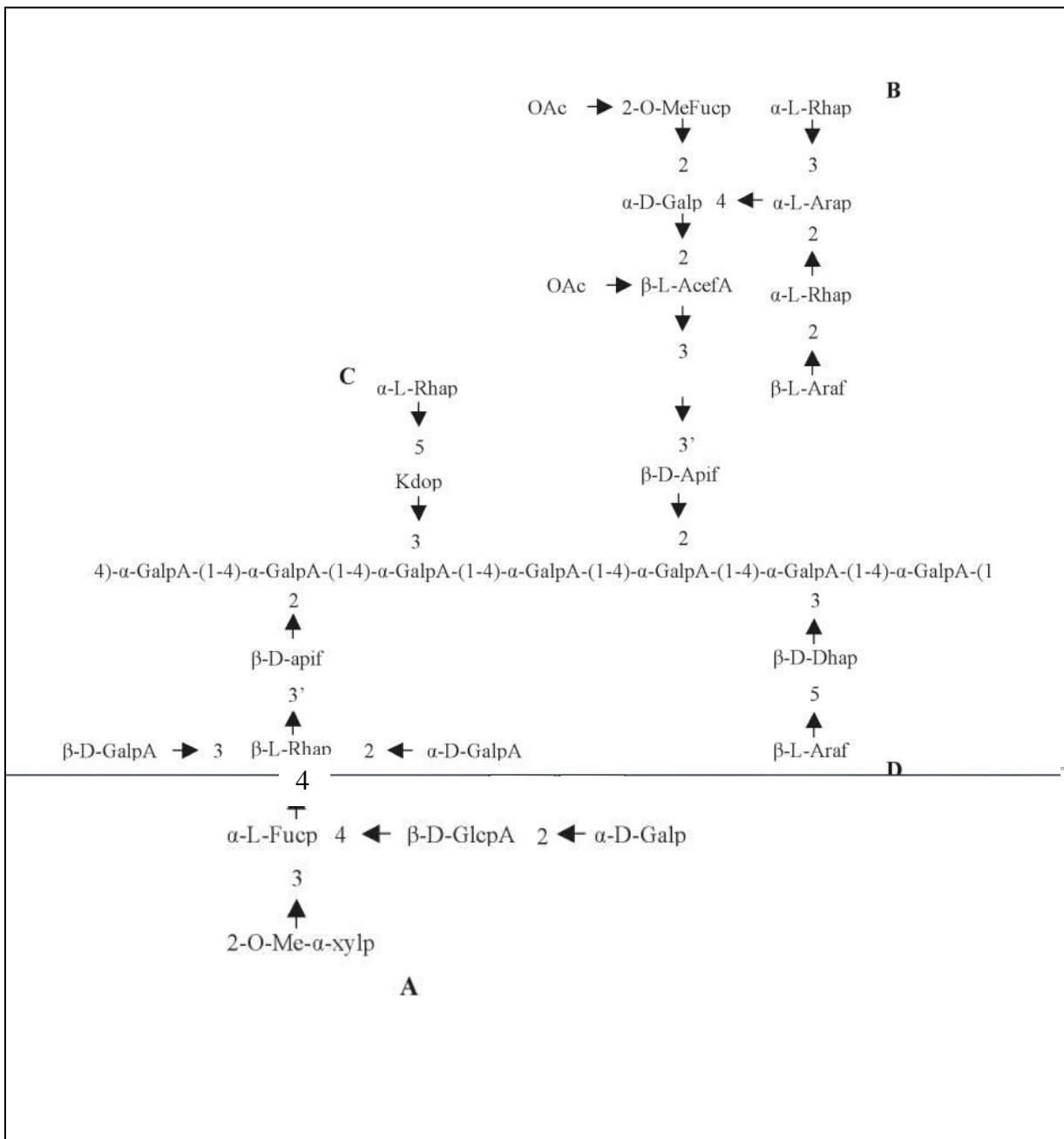


Figure 16 : Structure primaire du rhamnogalacturonane II avec quatre chaines Latérales de structure différente (A-D). (**Ridley et al., 2001**).

II.7. Application Potentielles des Fragments Pectiques

II.7.1. effetprébiotique des fragments pectiques

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

II.7.2. utilisation des fragments pectiques dans le domaine de la santé

Un grand nombre d'études *in vivo* et *in vitro* a été mené sur l'effet des NDO. Bien que certains des effets ne soient pas clairement démontrés, certaines données indiquent des effets cliniquement significatifs qui justifient l'ensemble des travaux actuels (**Swennen et al., 2006**). Par exemple, les NDO sont connus pour avoir des effets sur le métabolisme bactérien, la croissance des bactéries dans le colon, la diminution du risque de cancer, la modulation du système immunitaire, la diminution du cholestérol (**Mussatto et al., 2007 ; Qiang et al., 2009**). Les fragments pectiques font partie des NDO et peuvent présenter des effets santé. Ainsi, il a été rapporté que les fragments pectiques pouvaient inhiber l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et ainsi être utilisés comme des agents thérapeutiques. Par exemple, l'acide digalacturonique empêche l'adhésion d'*Escherichia coli* sur les cellules uroépithéliales *in vitro* (**Hotchkiss et al., 2003**). **Olano- Martin et al. (2003)** ont montré que les POS exerçaient un rôle protecteur en inhibant les shiga-toxines sécrétées par *Escherichia coli* O157:H7. Par ailleurs, certains effets anti-cancérogènes ont été rapportés. Les pectines et les POS sont capables d'induire une mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome HT-29 du colon (**Olano-Martin et al., 2003**). Des essais réalisés sur des

lignées de cellules myéloïdes (**Chauhan et al., 2005**) et sur des cellules cancéreuses de la prostate (**Jackson et al., 2007**) ont montré les mêmes effets. En outre, certains dérivés de la pectine ont été utilisés pour la préparation de vaccins, mais aussi en tant que vecteurs dans l'administration de produits pharmaceutiques (**Souto-Maior et al., 2010**).

II.7.3. Application des fragments pectiques dans le domaine agricole

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

Il a été également rapporté que les OGA sont capables d'induire la floraison sur des explants de tabac. Ils stimulent aussi la différenciation cellulaire

du péricycle et favorisent la maturation des tomates et d'autres fruits. Les OGA inhibent cependant l'elongation de la tige du pois(**Marfa et al., 1991 ; Dumville et al., 2000 ; Ridley et al., 2001 ; Baldan et al., 2003**). La plupart des réponses biologiques sont obtenues avec des OGA de DP variant de 10 à 16, dont le plus actif est de l'ordre de 12 (**Messiaen et al., 1994 ; Ridley et al., 2001 ; Baldan et al., 2003**). Plusieurs travaux indiquent cependant que les OGA autres que ceux de DP 10 à 16 peuvent être biologiquement actifs. Par exemple, les OGA de DP 2 provoquent l'inhibition des protéases dans les plants de tomate. De plus, les DP 2 et 3 insaturés à l'extrémité non réductrice sont actifs. Les OGA de DP 2 à 6 induisent la biosynthèse de l'éthylène dans les plants de tomate, le pentasaccharide (DP 5) étant le plus actif. Au cours de la maturation de la tomate, le triacide galacturonique (DP 3) inhibe la production de l'endopolygalacturonase (**Ridley et al.,2001**).

*Matériel
et
méthodes*

III. MATERIELS ET METHODES

I. Objectif

Notre travail vise essentiellement à pousser l'exploitation des sous produits de l'alimentation dans les usages industriels permettant ainsi un double bénéfice à savoir la réduction de leur rejet dans la nature et par conséquent leurs effets écologiquement indésirables ainsi que l'apport bénéfique qu'elles peuvent ajouter à ce domaine tout en essayant de ralentir la consommation excessive des algues des quelles provient l'agar-agar.

La présente expérimentation teste essentiellement le potentiel des déchets organiques , à pouvoir remplacer une substance végétale d'intérêt majeur dans la synthèse des milieux de culture in vitro à savoir l'agar-agar en mettant en examen les répercussions de la substance de substitution sur la croissance des germes et des organes visés, sur la gélification et la consistance des milieux de culture en question.

II. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour la courante étude consiste au zeste d'oranges (*Citrus sinesis*) et marcs de pommes. Le choix des deux substances dépond de leur disponibilité au cours de la période expérimentale ainsi que leur forte teneur en pectines 3.5 % – 5.5 % et 1.5 % - 2.5 % respectivement d'après AGNAN et al (2010), c'est la raison pour la quelle ces deux substances font l'objet de la source principale de pectines utilisée dans l'industrie agroalimentaire (**Diligent., 2010 ; Aubree., 2002 ; Agnan et al ., 2010**).

III. Méthodes

III.1. Préparation et prélèvement des échantillons

Les fruits sont triés lavés et désinfectés immédiatement après l'achat, et les parties visées sont séparés avec des dispositifs appropriés. Le zeste d'oranges (Zo) constitue la seule partie retenue de l'orange, cependant la partie centrale et les pépins sont retenus avec les écorces pour les marcs de pommes (Mc). 30 kg d'oranges et 50kg de pommes ont été utilisés dans la présente étude dont Les parties retenues pour les deux fruits sont fractionnées en deux lots. Chaque lot est soumis à une série de traitements afin d'extraire la fraction de pectines visée.

III.2. Extraction des pectines

Deux procédures d'extraction distinctes ont été suivies a fin de séparer et purifier la fraction de pectines contenue dans les échantillons étudiés :

III.2.1. Première procédure (figure 17)

III.2.1.1. Les prétraitements

Les échantillons sont soumis à une série de prétraitements ayant pour but d'amplifier la stabilité des MP durant le stockage selon Baississe (2009), et qui sont décrit comme suite.

A- Blanchiment :

Cette opération sert à l'inactivation des enzymes encore présents après le lavage, et dont le but est d'assurer la stabilité des matières premières (MP) durant le transport et le stockage jusqu'à l'utilisation (**Lopes da Silva., 2006**). L'opération consiste à faire passer l'échantillon dans l'eau chaude à 90° C pendant 10 à 15 mn (**Cheftel et Cheftel., 1978**).

B- Lavage :

Après le blanchiment, les échantillons ont immédiatement été refroidis par des lavages successifs avec de l'eau courante. Rappelons que ces lavages permettent d'éviter la dégradation des pectines pouvant avoir lieu à des températures voisines à 60 ° C, d'éliminer les sucres, les principes amers, les matières colorantes et les composés solubles dans l'eau.

C- Séchage :

Après le lavage, les matières premières sont pressées manuellement au travers d'un tissu en mousseline pour faciliter le séchage, celui-ci se fait dans une étuve expérimentale ventilée à 60° C jusqu'à ce que leur masse devienne constante. Pratiquement une durée de 48 semble suffisante pour ce-si.

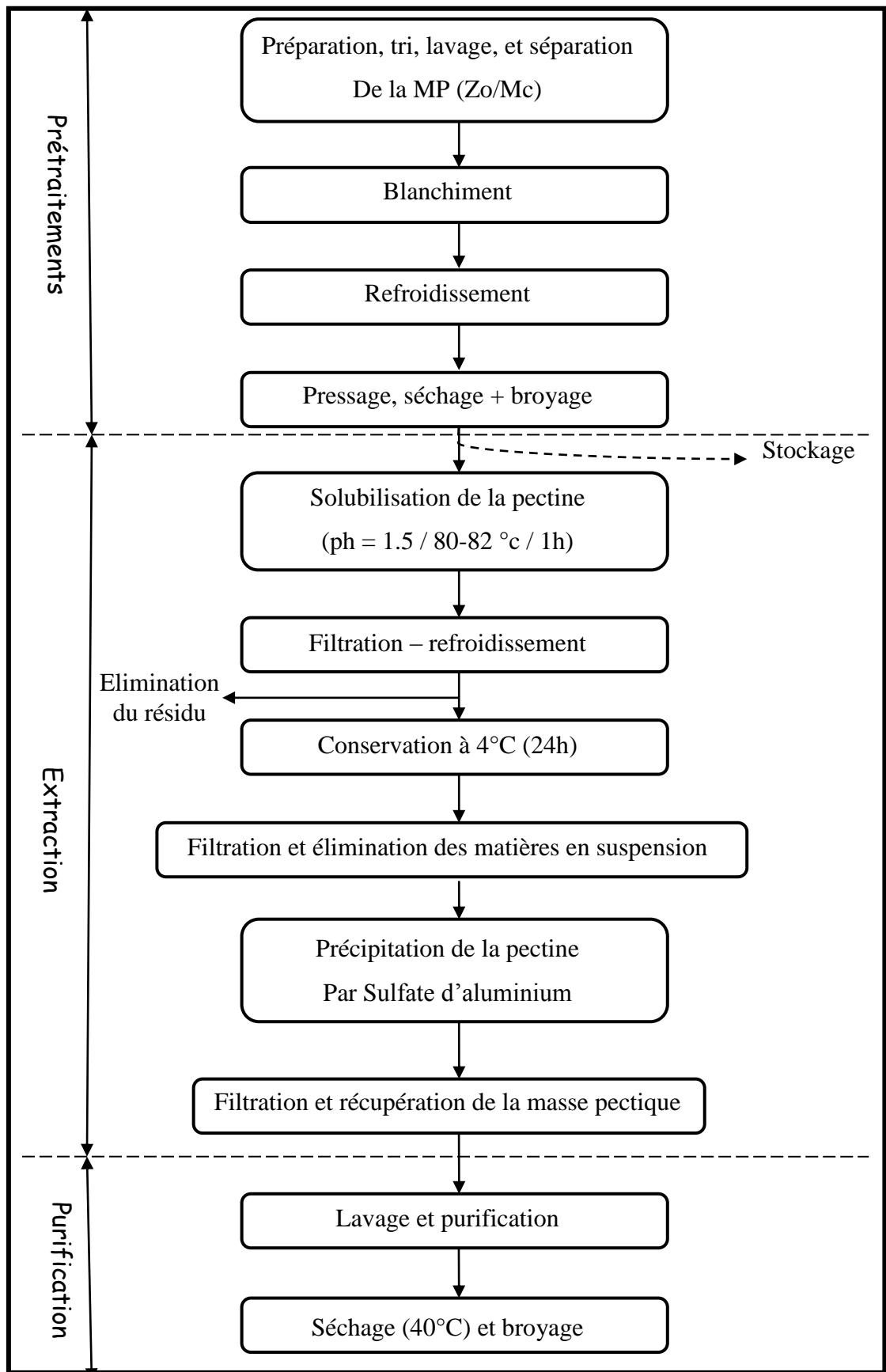


Figure 17 : Etapes et conditions d'extraction expérimentale des pectines (Baississe., 2009).

Avant d'être mises à l'extraction les MP séchées sont finement broyées pour augmenter le contact avec de l'eau chaude, et donc la quantité de pectine extraite par conséquent. Le résultat est donc, une poudre fine (planche 1).



Planche 1 : Les M.P après prétraitements.

III.2.1.2. L'extraction

L'extraction des pectines des différents types d'échantillons (écorce, pulpe et marcs) se fait en milieu acide à chaud, selon le protocole inspiré de Kratchanova et *al* (2004) décrit par Baississe (2009).

A. Solubilisation :

Les paramètres de solubilisation retenus sont ceux préconisés par Kratchanova et al (2004) :

- ✓ Rapport : échantillon sec/eau = 1 kg/50 l d'eau
- ✓ Température variable entre : 80 – 82 ° C
- ✓ Temps : 01 heure
- ✓ pH = 1.5

A 20 grammes de l'échantillon on ajoute 1 litre d'eau distillée, le pH est ramené à 1.5 par de l'acide chlorhydrique 0.5 N. Le mélange est chauffé pendant 01 heure à 80 – 82 ° C, sous agitation continue au moyen d'un agitateur électrique (Photo 1).

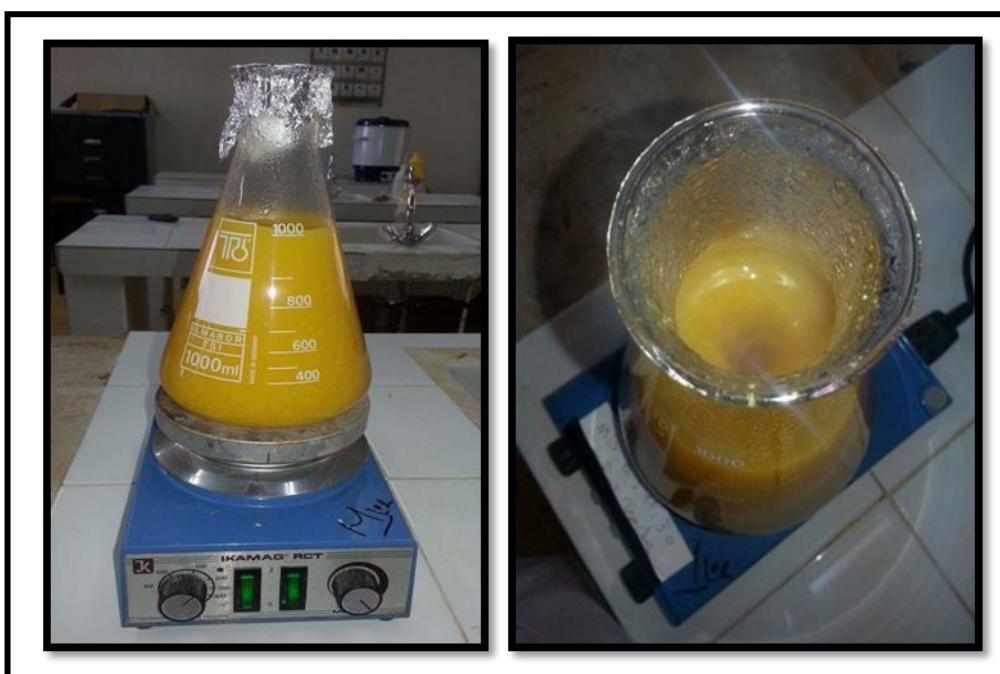


Photo 1 : Solubilisation des pectines.

B. Filtration :

A la fin de la solubilisation, le jus pectique est immédiatement filtré et refroidi pour éviter l'éventuelle augmentation de la viscosité et la dégradation de la pectine. La filtration se fait à travers un tissu de mousseline; Le dispositif de filtration baigne dans de la glace afin de permettre l'abaissement de la température.

Après la première filtration, les échantillons sont pressés manuellement et repris dans une quantité d'eau équivalente au 1/5 de celle ayant servie à la solubilisation, puis sont soumis à une seconde filtration, le jus pectique obtenu est conservé à 4° C pendant 24 heures.

C. Purification de l'extrait :

Après les séjours de 24 heures au réfrigérateur, le jus pectique est filtré pour permettre l'élimination des particules en suspension, encore présentes, malgré les séries de filtrations précédentes et, assurer une meilleure clarification (photo 2).

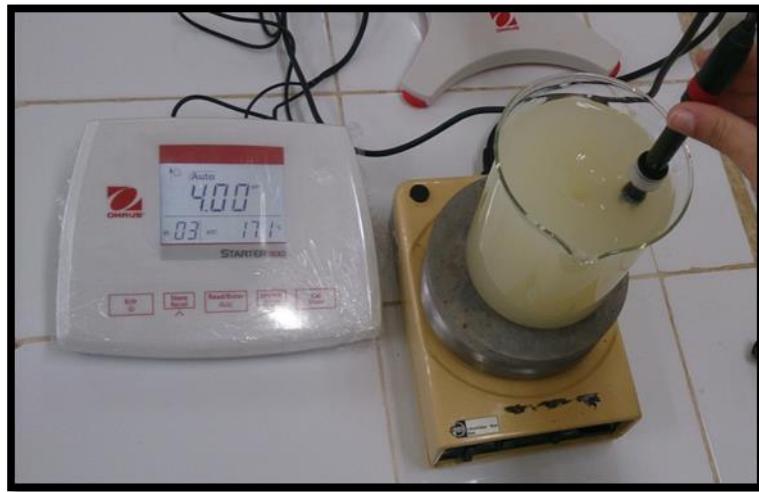


Photo 2 : Purification de l'extrait pectique.

D. Précipitation :

L'agent de précipitation retenu dans notre étude est le sulfate d'aluminium. Les conditions de précipitation des pectines par le sulfate d'aluminium sont données par Dennapa et *al* (2006). À 1 litre de jus pectique, on ajoute 60 ml de chlorure d'aluminium (le volume peut aller de 0.4 à 1.2 %).

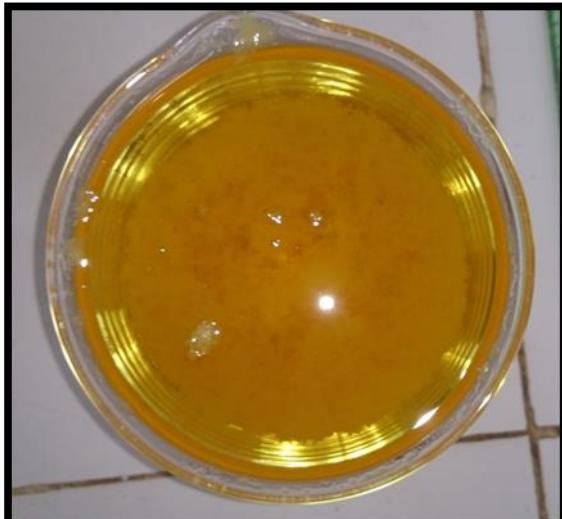
Les pectines sont précipitées après l'ajustement du pH dans un intervalle de 3.5 à 4 par l'addition d'ammoniac sous agitation continu. Le trouble est laissé se stabiliser pendant 30mn à la température ambiante puis 01 heure à 4° C, ce qui permet la formation du gel pectine-hydroxyde d'aluminium. Le gel obtenu est récupéré par filtration (planche 2).



Adition d' $\text{AL}_2(\text{SO}_4)_3$ et ajustement du



Gel : pectine-hydroxyde d'aluminium



Précipitatio



Pectine fraiche après

Filtration et récupération du gel

Planche 2 : Précipitation des pectines avec le sulfate d'aluminium.

E. Purification des pectines :

Les gels pectine- hydroxyde d'aluminium obtenus à partir de différentes MP (origines végétales) subissent plusieurs lavages ayant pour but d'éliminer les impuretés précipitées avec les pectines et l'excès d'aluminium.

Selon Kratchanova *al* (2004) par exemple, les pectines subissent les lavages suivants :

- ✓ Le premier lavage à l'éthanol 96 %
- ✓ Le deuxième lavage à l'alcool acidulé (éthanol 70 % à 0.5 % Hcl)
- ✓ Le troisième lavage à l'alcool 70 % au pH neutre
- ✓ Le quatrième lavage à l'acétone, permet d'éliminer les traces d'acide (Hcl) et d'alcool absorbées par les pectines et d'émettre celles-ci et de faciliter leur séchage (**McCready.,1970 ; Constenla et Lazano., 2003**).

C'est cette succession de lavage que nous avons appliquée à nos pectines.

F- Séchage et stockage des pectines :

Les pectines obtenues sont séchées dans l'étuve à 40 °C jusqu'à ce que leur masse devienne constante dont une durée de 24 heures semble suffisante pour cela. La pectine séchée est finalement réduite en poudre fine en s'aidant d'un broyeur à café. Le broyage sert à faciliter la solubilisation pour les essais ultérieurs (planche 3).

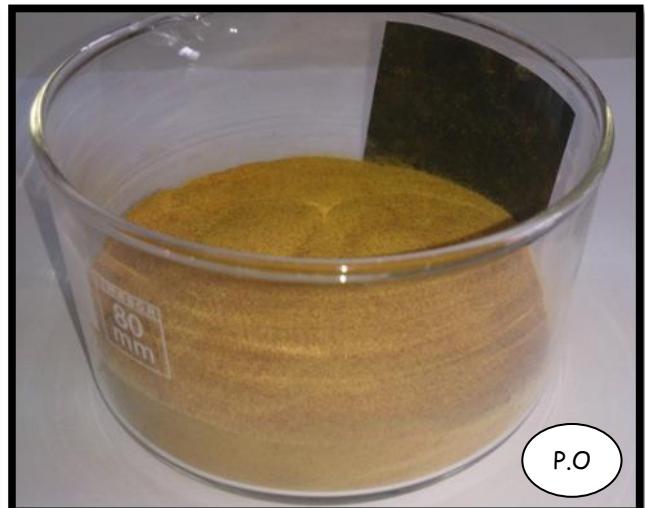
N.B :
P.P : Pectine de pommes
P.O : pectine d'oranges



Broyage



P.P



P.O

Planche 3 : La forme finale de la pectine extraite.

Les étapes citées ci-dessus conduisant à l'obtention de la pectine purifiée sont détaillées dans la figure précédente (figure 17).

III.2.1. Deuxième procédure (figure 18)

Pour cette procédure expérimentale, les MP sont directement séchés dans une étuve expérimentale ventilée à 60°C jusqu'à ce que leur masse devienne constante (expérimentalement, une période de 48 h semble suffisante pour un séchage total des échantillons), puis broyées en poudre fine afin de faciliter les étapes ultérieures de l'extraction.

II.2.1.1. Traitements préalables à l'extraction (planche 4)

50 g de MP en poudre sont introduits dans un erlen meyer contenant un Mélange éthanol/toluène (V-V) et mis sous agitation pendant 14h. Cette opération est répétée deux fois pour éliminer le maximum d'impuretés cytoplasmiques (lipides, etc.....).

Après filtration, le résidu est placé dans l'éthanol sous agitation pendant 2h pour éliminer les traces de toluène, le résidu est ensuite rincé trois fois à l'eau distillée pour éliminer l'éthanol, puis séché à l'étuve à 60°C après avoir été lavé à l'acétone (**Hachem et al., 2015**).

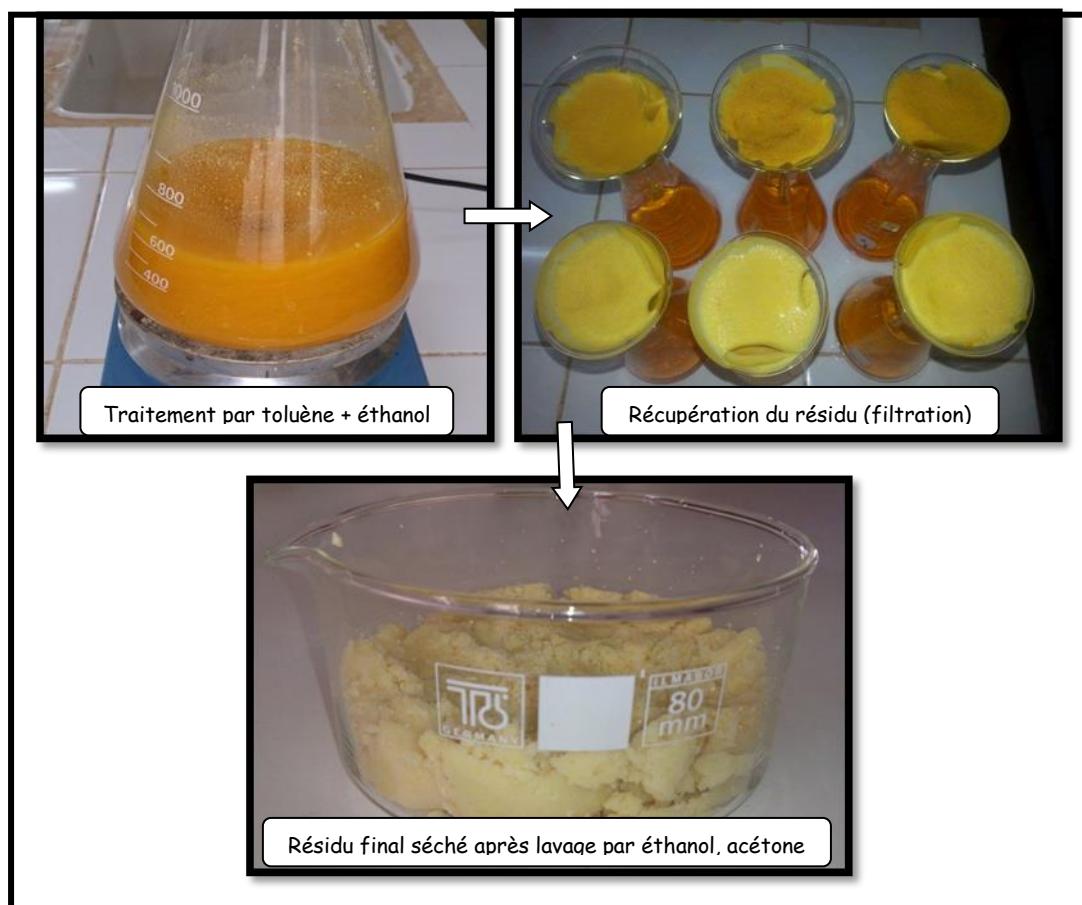


Planche 4 : Traitements préalables à l'extraction.

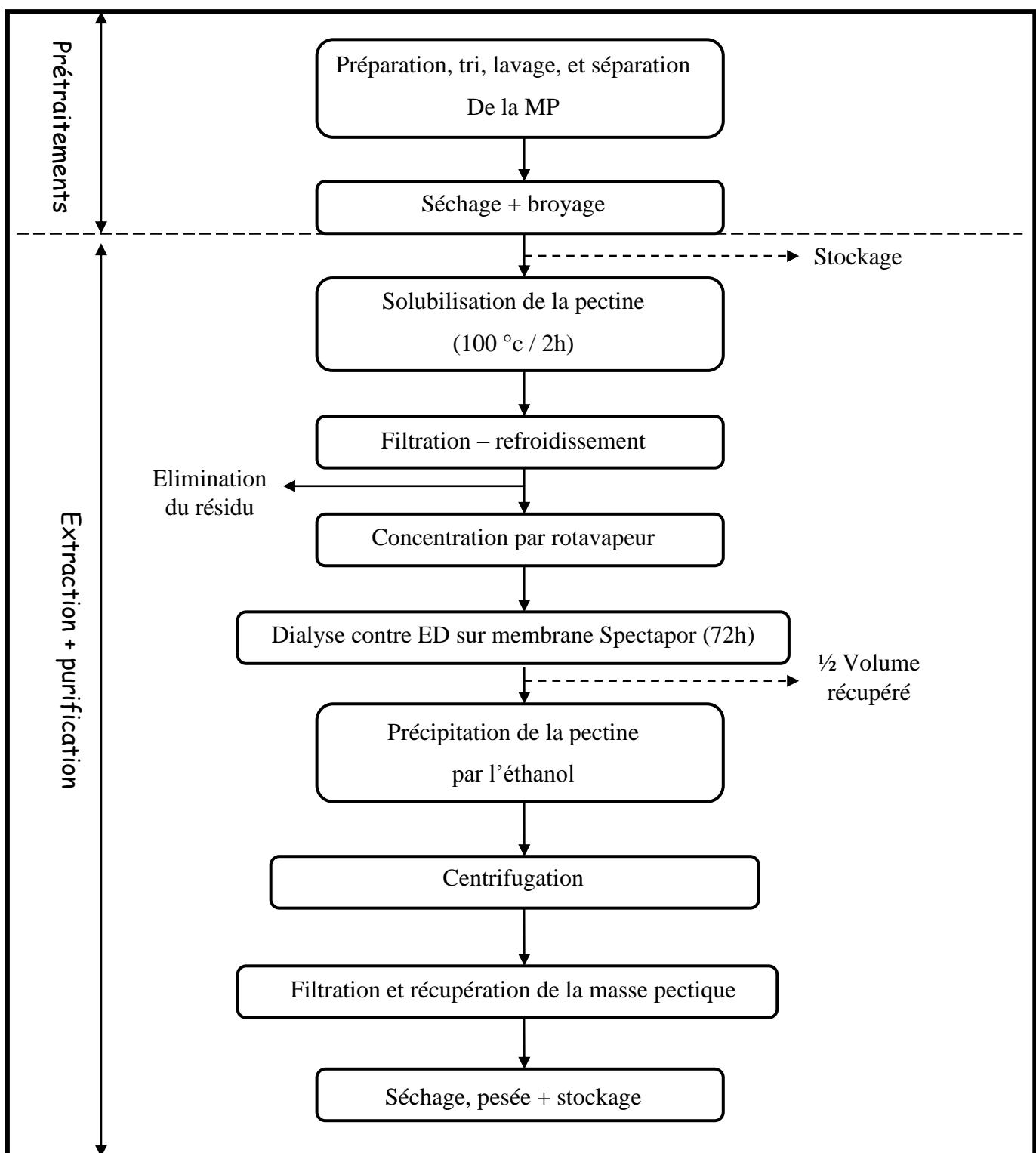


Figure 18 : Etapes et conditions d'extraction expérimentale des pectines (**Hachem et al., 2015**).

II.2.1.2. Extraction des pectines

Les MP ont été traités à l'eau à 100° C deux fois durant 2 heures. Après ce là Une concentration par rotavapeur intervient, dans le but de réduire à 80 % la teneur en eau du jus pectique obtenu par l'opération précédente (photo 3).

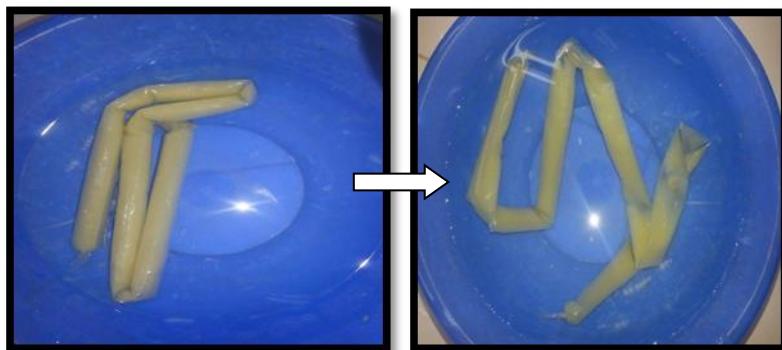


Photo 3 : Concentré pectique obtenu à la sortie du rotavapeur.

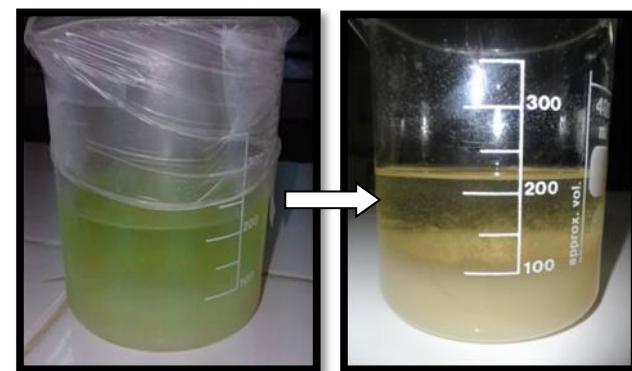
Une dialyse contre l'eau distillée est réalisée sur une membrane Spectrapor dont le seuil de coupure est compris entre 6000 et 8000 Da, suivie d'une précipitation des composés pectiques par l'éthanol, avant de procéder à une centrifugation pour permettre la récupération de la fraction visée (**Hachem et al., 2015**). Il est à noter qu'une partie du jus pectique récupéré après la dialyse est retenue à l'état liquide pour tester sa reconstitution ultérieure.

La pectine obtenue par filtration est ensuite séchée dans une étuve à 60 °C, pesée et stockée pour son usage ultérieur (planche 5).

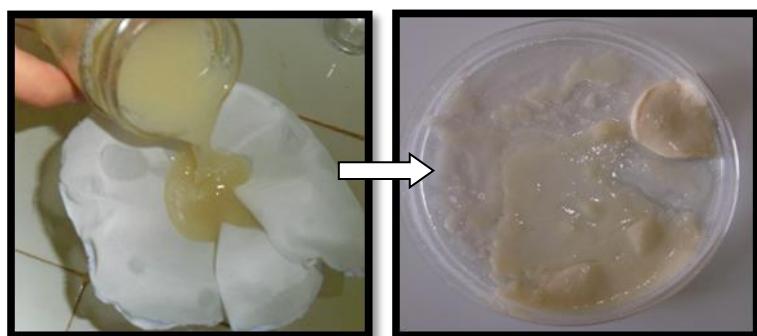
Elimination
d'eau par
dialyse



Précipitation
Par
l'éthanol



Récupération
du résidu
par



Séchage et
récupération
de la masse
pectique

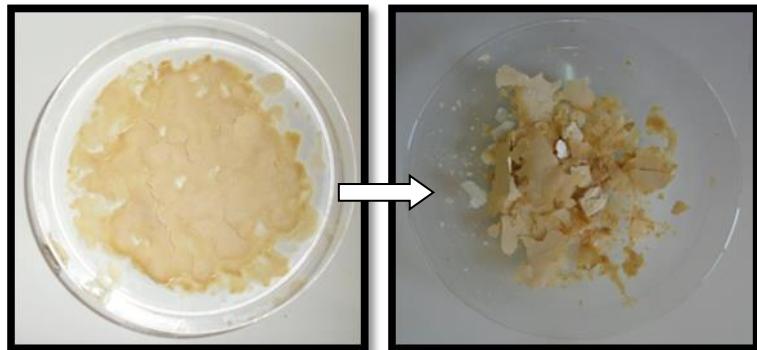


Planche 5 : Purification, précipitation, et récupération des pectines.

III.3. Reconstitution des milieux de culture à base de pectine

La reconstitution bute essentiellement à tester le pouvoir gélifiant des pectines extraites dans les milieux de culture dont on distingue :

- ❖ La pectine d'oranges extraite par fusion de la température et l'acidité (80°C / pH =1.5).
- ❖ La pectine d'oranges extraite par la température (100 °C).
- ❖ La pectine de pommes extraite par fusion de la température et l'acidité (80°C / pH =1.5).
- ❖ La pectine pure commercialisée (Biochem chemopharma).

III.3.1. Les milieux de culture

Les milieux de culture mises en examen dans la courante étude présentent la même composition ainsi que les mêmes proportions que celle des milieux commercialisés à l'exception de l'agent gélifiant (qui est l'Agar- Agar normalement), destiné à être remplacé par l'agent gélifiant testé (la pectine), dont les milieux testés sont :

- ❖ Bouillon PDA (gélose Potatoes Dextrose Agar (PDA) exempté d'Agar).
- ❖ Bouillon nutritif B.N (dont l'adjonction de l'Agar le transforme en gélose nutritive G.N).
- ❖ Bouillon M.S (milieu de Murashige et skoog M.S dépourvu d'Agar).

N.B : les essais effectués sur les différents milieux de culture sont accompagnés par des essais blancs sur l'eau distillée pour établir une comparaison.

III.3.2. Incorporation et solubilisation des pectines dans les milieux de culture

La solubilisation des pectines dans les milieux de culture (photo 4) se fait en faisant varier séparément et/ou parallèlement plusieurs paramètres dont les paramètres variés sont :

A. La quantité des pectines :

La quantité des pectines incorporée est progressivement et soigneusement contrôlée dont le point critique de départ est celui correspondant à la quantité d'Agar présente dans le milieu étudié la quantité est évaluée par gramme de pectine ajoutée sur litre de milieu étudié (g/l).

B. La température :

Au cours de la solubilisation, la température est progressivement levée jusqu'à un degré propice pour la solubilisation complète de la pectine incorporée.

C. Le pH :

Le pH est conduit au cours de la reconstitution du milieu de culture à base de pectines lentement et soigneusement à l'acidité/basicité puis reconduit vers la basicité/acidité. Le pH est constamment contrôlé dont les points critiques sont :

- ❖ Le pH initial du milieu de culture (P.I, mesuré au moment de l'addition de la pectine).
- ❖ Le point de la solubilité (P.S, pH mesuré au moment où la solubilisation de l'agent gélifiant est complètement achevée).
- ❖ Le point de gélification totale (P.G, pH mesuré au moment où la gélification du milieu est complète).

Le pH est conduit vers l'acidité par l'HCl (1N, 2N, 3N, 4N, 6N) dont chaque solution est testée séparément. Cependant le KOH utilisé est du 1N.



Photo 4 : Reconstitution des milieux de culture à base de pectines.

III.3.3. Inspections sensorielles du milieu de culture reconstitué :

- ✓ Le point de solubilisation complète est déterminé en laissant décanter le milieu reconstitué pendant 5–10 min après l'arrêt de l'agitation, permettant ainsi de desserrer toute particule de pectine en suspension. Il est donc achevé quand le milieu est présent sous une forme de solution aqueuse irréversible (Photo 5).

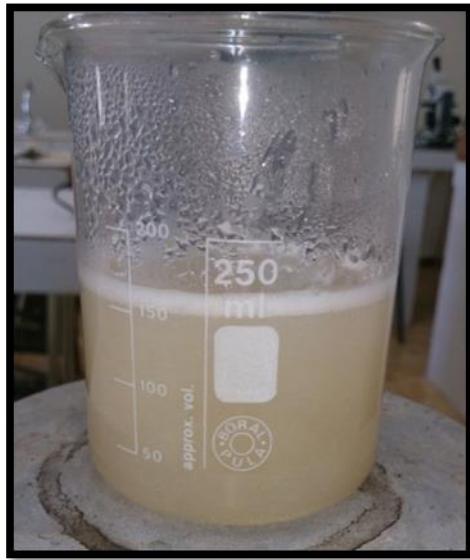


Photo 5 : Pectine complètement solubilisée dans le milieu de culture.

- ✓ Le point de gélification est achevé quand le milieu de culture prend une forme solide ou semi solide ou la totalité du milieu de culture forme une masse irréversible qui se tient en faisant incliner le récipient ayant servi à la reconstitution (bécher), ou même en le bouleversant (photo 6).

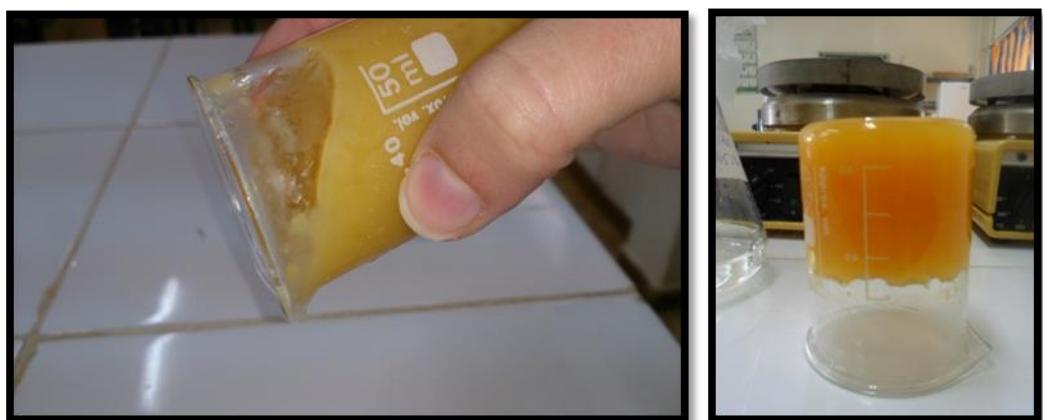


Photo 6 : Milieu de culture gélifié par la pectine.

III.4. Traitements des données :

Les données pratiques obtenues pour le rendement en pectine (g de pectine / g de MP), le pH de solubilisation, et le pH de gélification sont traitées par un logiciel tableur. Microsoft Office Excel 2007 est utilisé pour le calcul des moyennes établies pour la comparaison des données.

*Résultats
et
Interprétation*

IV. RESULTATS ET INTERPRETATION

I. Rendement en pectines extraites

Deux méthodes distinctes d'extraction ont été suivies pour notre approche expérimentale appliquée sur les deux types notés de M.P, dont le rendement et les caractéristiques chimiques et sensorielles sont relativement variables.

Nos rendements en pectines (exprimés en %), obtenus des différents types des fruits (pommes, oranges) dans les conditions précisées dans la partie mode opératoire, sont illustrés dans le tableau ci-dessous et figurés dans la figure 19.

Tableau 6 : Le rendement en pectines des différents types de M.P et procédés d'extraction.

Nature de la pectine	Quantité de pectine sèche obtenue pour 1l de jus pectique = 20g de M.P (g)	Quantité de pectine sèche obtenue pour 1g de M.P (g)	Rendement en pectine (%)
Pectine de pommes extraite par la 1 ^{ère} procédure (P.P ₁)	1.62	0.08	08
pectine d'oranges extraite par la 1 ^{ère} procédure (P.O ₁)	6.91	0.34	34
pectine de pommes extraite par la 2 ^{ème} procédure (P.P ₂)	Négligeable (< 0.005g)	---	---
pectine d'oranges extraite par la 2 ^{ème} procédure(P.O ₁)	0.28	0.014	1.4

N.B :

Le rendement final en pectine est obtenu par le rapport suivant :

$$R(\%) = [PEC (g) / M.P (g)] \times 100.$$

PEC : la masse de la pectine obtenue pour 1 g de M.S.

M.P : La masse de la matière première (1g).

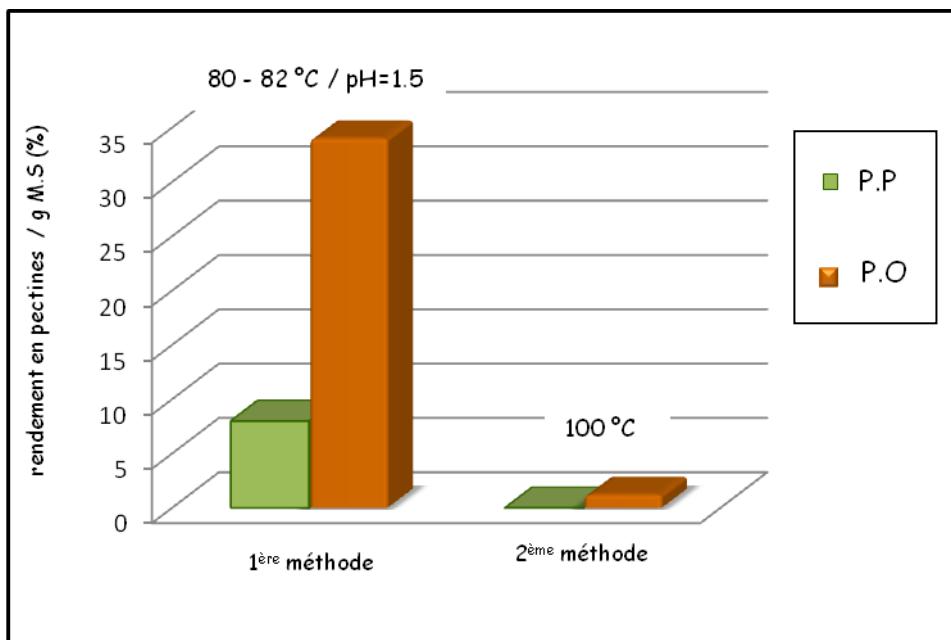


Figure 19 : Le rendement en pectines de pommes et pectines d'oranges obtenus

La première constatation à retenir de ces résultats, est que la teneur en pectine diffère d'un fruit à l'autre malgré les mêmes conditions opératoires retenues.

Le zeste d'oranges affiche un rendement considérablement meilleur que celui obtenu pour les marcs de pommes compte tenu pour les deux protocoles d'extraction retenus, et dont l'extraction à 80°C, pH = 1.5 permet d'avoir une quantité de 0.08 g/g de M.S (soit un rendement de 8 %) seulement pour les Mc, contre 0.34 g / g M.S (soit un rendement de 34 %) pour le Zo ce qui concède la forte teneur en pectines prévue pour le zeste.

Le rendement obtenu par traitement thermique à l'eau chaude à 100°C (2^{ème} méthode d'extraction) pour les Mc demeure toujours inférieur à celui obtenu pour le Zo. Un rendement inférieur à 0.001g / g M.S (négligé) est obtenu pour les Mc contre un rendement de 0.014 g / g M.S (soit un rendement de 1.4 %) obtenu pour le Zo. ces résultats confirment le bon rendement obtenu pour la première procédure.

La deuxième constatation à retenir de ces résultats, est que pour la première procédure validée pour l'extraction, la précipitation et la purification des pectines, dont l'action conjuguée de la température et l'acidité permet l'obtention d'un meilleur rendement pour les Mc (08 % contre un rendement quasiment nul pour les méthodes 1 et 2 respectivement), ainsi que pour le Zo (34% contre 1.4% pour les méthodes 1 et 2 respectivement). Dans le même ordre d'idées l'effet de la température semble moins déterminant dont l'extraction ayant intervenu à 80°C (pH =1.5) a donné un meilleur rendement que celle ayant été effectuée à 100°C d'où une

différence de 8 % a été enregistrée pour les Mc et 32.8 % pour le Zo en partant des résultats répertoriés dans le tableau 6, et représentés dans la figure 19.

II. Incorporation des pectines dans les milieux de culture *in vitro*

La solubilisation et la géification des différentes classes de pectines a été effectuée séparément dont la température, et le ph sont variés en fonction de la nature de la pectine solubilisée. La quantité de pectine et celle de saccharose sont aussi des facteurs à entrer en jeu pour la conception du milieu visé.

II.1. Pectine commerciale

II.1.1. Solubilisation

Cette fraction de pectine est solubilisée seulement par l'action de la température, dont 100 °C semble idéale pour la solubilisation complète. L'addition des pectines est faite progressivement. Les proportions testées et les résultats sont répertoriés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Résultats de la solubilisation de la pectine commerciale dans les solutions testées.

Quantité de pectines incorporée dans la solution (g/l)	10	20	30	40	45	50	60
E.D	+	+	+	+	+	+	+
Gélose : Murashige et Skoog (M.S ss)	+	+	+	+	+	-	-
Gélose : Potatoes Dextrose Agar (PDA)	+	+	+	+	-	-	-
Gélose Nutritive (G.N)	+	+	+	+	+	+	+

N.B :

+ : solubilisation complète de la pectine testée dans la solution.

- : solubilisation incomplète de la pectine testée dans la solution testée.

La pectine commerciale est solubilisée dans les 3 milieux d'essais dont le pH est compris entre 6.1 et 6.9 pour cela, cette gamme de pH semble parfaite pour la solubilisation complète de cette dernière. Les résultats sont représentés par la figure 20.

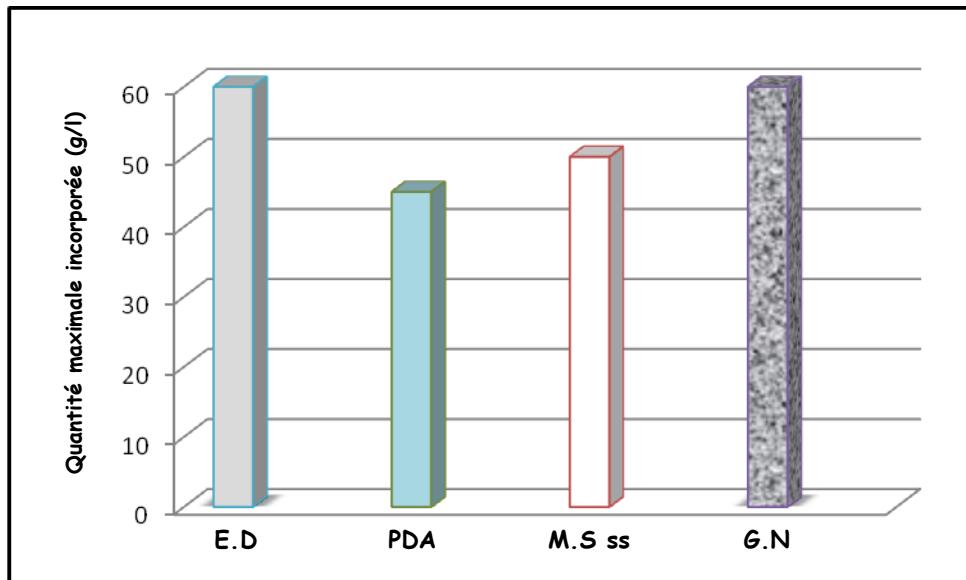


Figure 20 : Quantité maximale de pectine commerciale incorporée dans les milieux d'essais.

D'après les résultats communiqués dans le tableau ci-dessus, il en sorte que la gélose PDA solubilise une quantité pouvant arriver à 40 g/l suivie de la gélose M.S ss qui accepte jusqu'à 45 g/l, et enfin la G.N et l'E.D dans lesquels on a solubilisé, avec succès jusqu'à 60 g/l (c'est la quantité maximale testée). Ces variations sont accordées à l'activité d'eau variable d'un milieu à l'autre ce qui implique la disponibilité de l'eau pour la formation des liaisons chimiques avec les molécules de pectine.

II.1.2. Gélification

La gélification de la pectine commerciale n'est toujours pas atteinte, même si tous les paramètres intervenant dans la formation du gel, décrits par Capel et *al* (2006), ainsi que par Guillotin et *al* (2007) sont pris en considération :

- La température a été conduite à la T° ambiante directement après la solubilisation totale de la pectine dans les 4 milieux testés ;
- Le saccarose est incorporé progressivement jusqu'à l'atteinte du seuil de 30 g / l, cette procédure semble augmenter la viscosité de solution pectique mais pas autant pour former le gel irréversible souhaité.

II.2. Pectine d'oranges extraite avec la 2^{ème} méthode (P.O₂)

II.2.1. solubilisation

Les essais ont été établis uniquement sur la gélose M.S ss et dont les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Résultats pour la solubilisation de la pectine P.O₂ dans les solutions testées.

Quantité de pectines incorporée dans la solution (g/l)	10	20	30	40
Solubilité sur M.S ss	+	+	-	-
Solubilité sur G.N	+	+	-	-

Les essais effectués sur cette pectine (P.O₂) sont très réduits faute de sa pénurie (rendement très faible de la méthode d'extraction). La solubilisation de cette pectine est achevée à 100°C environ, dans un pH neutre (le pH mesuré au moment de la solubilisation est de 6.82 pour M.S ss et 6.1 pour G.N). La solubilité de cette fraction pectique est très réduite en partant des résultats détaillés dans le tableau précédent dont 11 de milieu M.S ss ne peut solubiliser que 20 g de P.O₂ (contre 45 g pour la pectine commerciale et 60 g pour la P.O₁), (photo 7).



Photo 7 : Milieux de cultures reconstitués à base de P.O₂.

II.2.2. gélification

La gélification de la P.O₂ est tentée sur le milieu M.S ss, en virant les paramètres intervenant dans la formation du gel. La texture formée présente une viscosité importante à température ambiante, après l'addition progressive du saccarose (allant à 100g / l). Cette texture est jugée trop molle en comparaison avec la consistance du milieu de culture recherchée. La conception des milieux M.S ss, G.N et PDA à base de pectine maintenue en suspension est également bloquées en phase de gélification (planche 6), la variation du pH (6.2 – 6.7), est jugée inadéquate pour le présent cas, en raison de la faible quantité de pectine dissoute dans le milieu (dilution excessive du milieu).

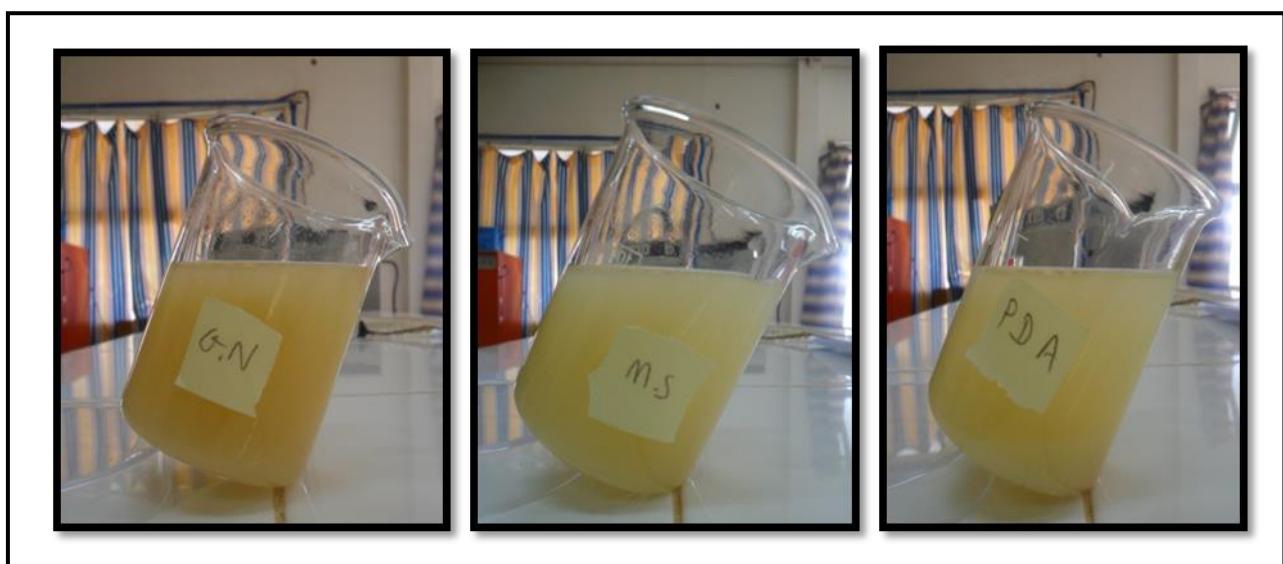


Planche 6 : Texture et consistance des milieux de cultures à base de P.O₂ après addition du saccarose.

II.3. Pectine d'oranges et de pommes extraites avec la 1^{ère} méthode (P.O₁, P.P₁)

II.3.1. Solubilisation et gélification

La P.O₁ et la P.P₁ est insoluble pour le pH initial du milieu de culture d'essais (variant entre 6.04 et 7.1), c'est donc, c'est en conduisant le pH vers l'acide ou le basique, que la solubilisation avait lieu. Les gammes de pH ayant servi à la solubilisation (pH.S) de ces derniers en milieu acide, les solutions employées et les valeurs de pH enregistrées au moment de la gélification (pH.G) dans l'E.D sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Conditions expérimentales pour la solubilisation et la gélification de la solution pectiques (E.D - P.O₁ / P.P₁).

Solution acide utilisée pour la solubilisation	Volume nécessaire pour la solubilisation totale de la pectine (ml)	pH mesuré au moment de la solubilisation totale	Volume du KOH 1N nécessaire pour la gélification totale du milieu (ml)	pH mesuré au moment de la gélification
HCl (1 N)	120	1.42	120	2.77
HCl (2 N)	80	1.51	80	2.60
HCl (3 N)	40	1.59	40	2.75
HCl (4 N)	40	1.70	40	2.72
HCl (6 N)	20	1.63	120	2.85

N.B : les valeurs communiquées dans le tableau correspondent à 20g de P.O₁ ,11 d'E.D.

Les résultats obtenus pour la mesure et l'évaluation des valeurs de pH enregistrées au moment de la solubilisation totale de la pectine dans le milieu de culture étudié (Pec – E.D), ainsi que c'elles enregistrés pour la gélification totale de la solution sont représentés graphiquement dans la figure suivante.

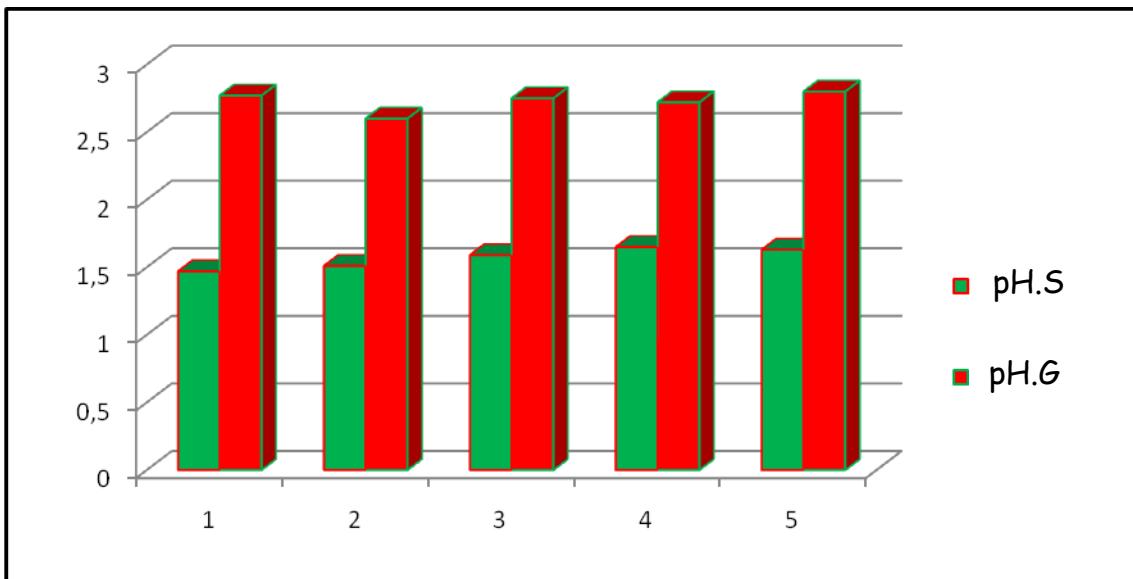


Figure 21 : Enregistrement du pH pour la reconstitution de la solution P.O₁ / P.P₁ – E.D.

Partant des résultats communiqués dans le tableau 9 et figure 21, il s'avère que la solubilisation totale des Pectines se manifeste dans un intervalle de pH variant entre 1.42 et 1.70 avec un pH.S moyen de 1.57, pour toutes les concentrations HCl (exprimées en Normalité) employées pour ce là. Cependant la gélification intervient pour un pH variant entre 2.60 et 2.85 (pH.G moyen = 2.73). Les variations enregistrées pour le volume d'HCl et de KOH, impliqués respectivement, dans la solubilisation et la gélification des pectines dans la solution testée sont représentées graphiquement dans la figure 22.

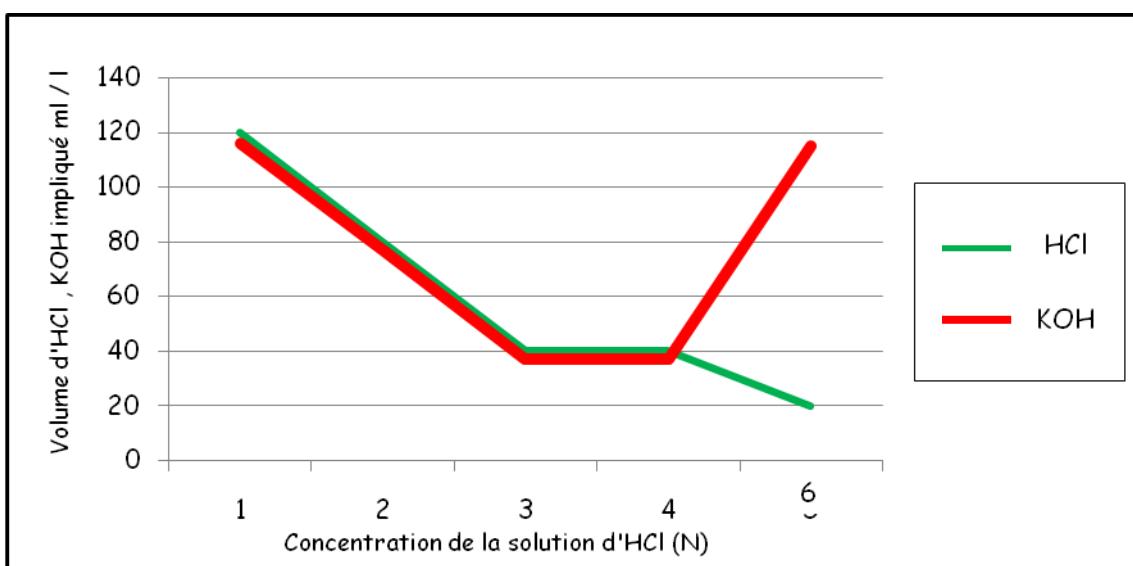


Figure 22 : Volume d'HCl et de KOH impliqués dans la reconstitution de la solution pectique (E.D – P.O₁/ P.P₁).

Le volume d'HCl nécessaire à la solubilisation des pectines dans la solution est quasiment égal à celui du KOH nécessaire à la gélification du milieu, d'après la figure précédente. Ce si est confirmé par l'allure des deux courbes, qui varient d'une cadence plus au moins homologue. Les volumes incrustés ont tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration de la solution d'HCl impliquée, compte tenu pour le KOH qui présente quasiment les mêmes variations.

En effet l'addition de grands volumes d'HCl et de KOH semble conduire à une dilution de la solution pectique ainsi que tous les composants du milieu (le volume du milieu augmente de 10 % environs pour HCL 1N par exp), Ce qui se répercute sur les proportions conventionnées. Et pour cela notre étude favorise l'utilisation d'HCL 4N pour les essais ultérieurs à fin de réduire l'effet en question (photo 8).

La solubilisation en milieu basique a été jugée inadéquate pour la formulation du milieu de culture à cause de la forte dilution de la composition conventionnée des milieux de culture testés (annexe 1). La solubilisation a eu lieu pour le milieu M.S ss à pH = 9.2 (obtenu en ajoutant 16 ml de KOH 1N à 50 ml de la solution pectique soit plus de 320ml / 1 de la solution pectique) et la gélification a eu lieu à ph = 3.7 (obtenu en ajoutant 5 ml HCl 6N à 50 ml de la solution pectique) soit 100 ml / 1 de la solution pectique), conduisant ainsi à un volume supplémentaire d'à peuprès 42 %.

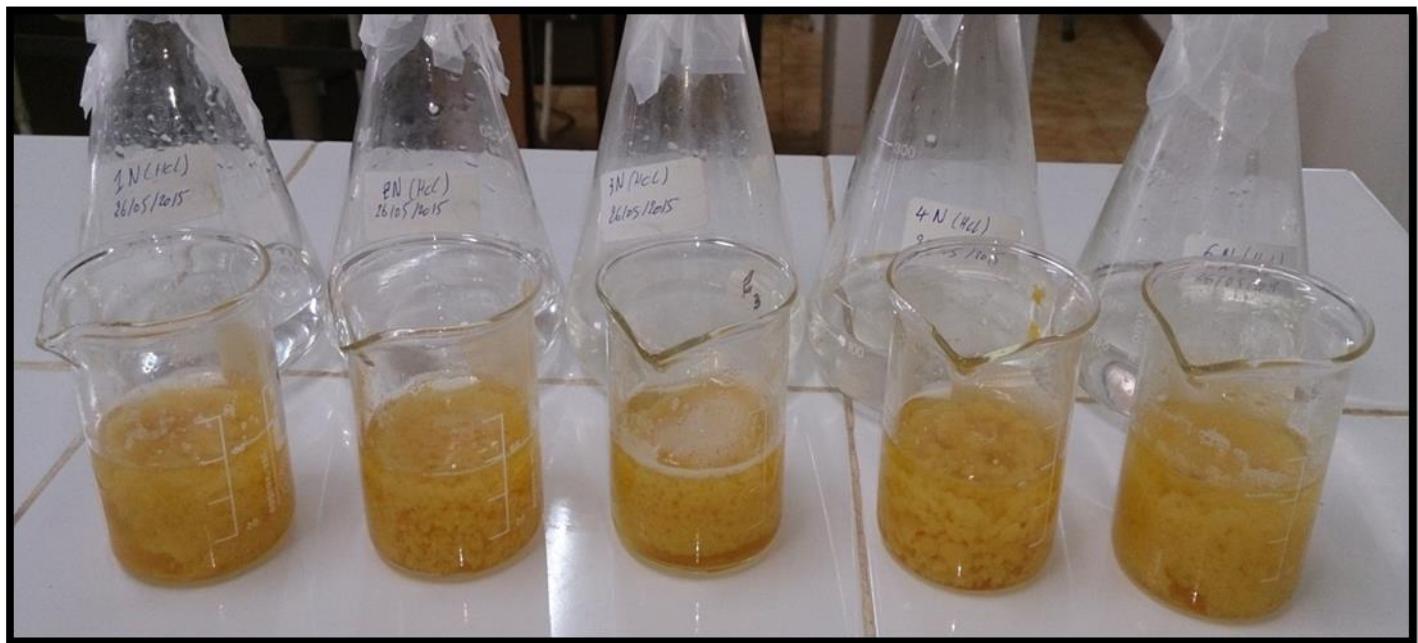


Photo 8 : Gélification expérimentale des milieux de cultures par la pectine extraite.

- ✓ Le gel obtenu sur milieu M.S ss, PDA, G.N en faisant dissoudre une quantité de 20g/l et 30 g/l est si moelleux et rapidement cassable (abimé par l'agitation au cours de l'homogénéisation). ces effets sont accordés à la formation lente du gel, Compte tenu pour toutes les concentrations d'HCl impliquées (planche 7). A la lumière des ces données, Notre étude suggère la nécessité d'une gélification rapide.

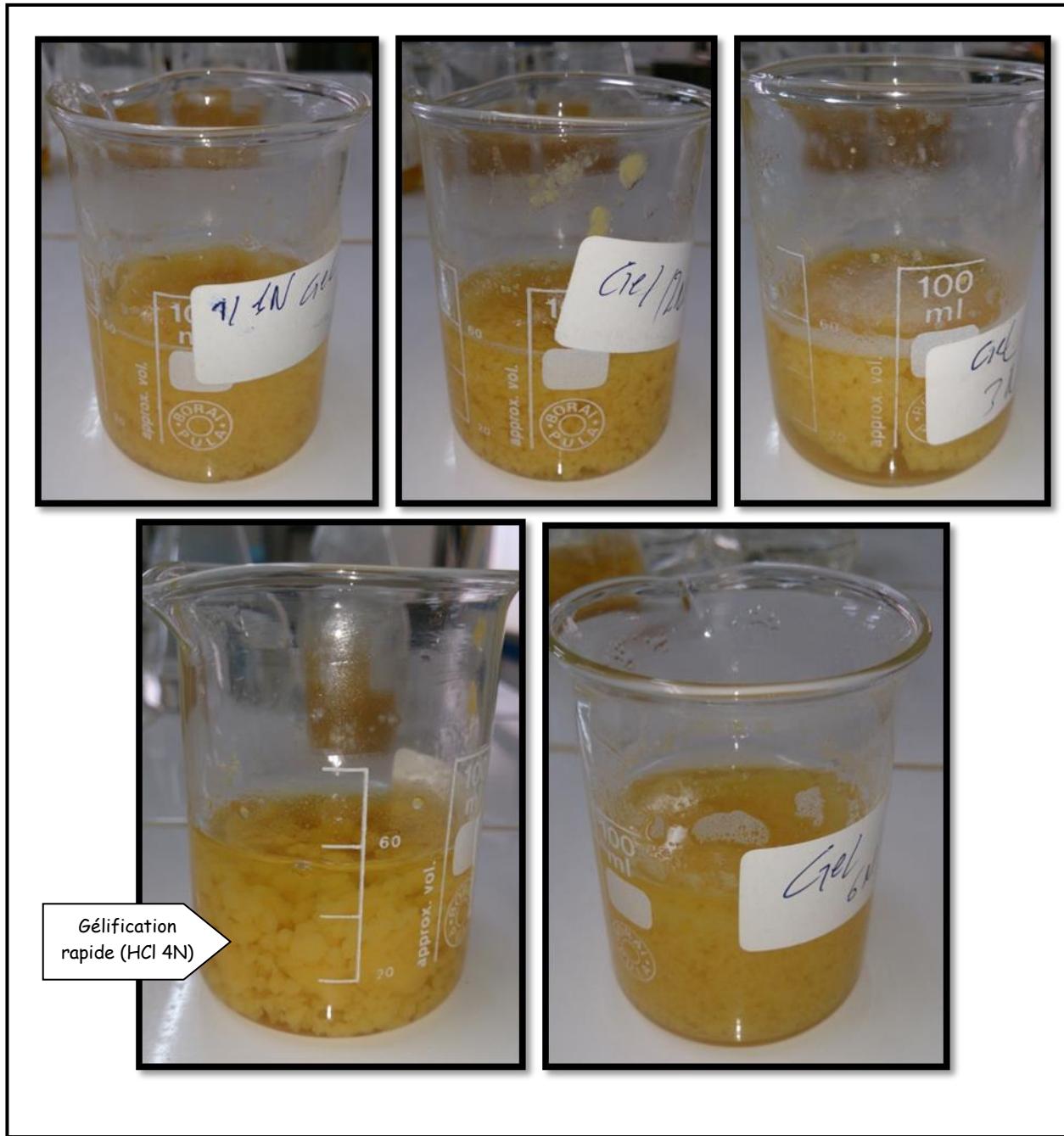


Planche 7 : Géification des milieux de culture .

- ✓ Une formation optimale du gel suite à une coagulation rapide est remarquée à pH = 3.01 pour la gélose M.S additionné de saccarose (quantité équivalente à 30g/l), dont la solubilisation a été induite par de l'HCl 4N pour la P.O₁ (une quantité équivalente à 30g/ l). (photo 9).

- ✓ Le milieu M.S additionné de P.P₁ (30 g/l), et de saccarose (30g/l), solubilisé à pH = 1.46 par L'HCl 4N se coagule rapidement à pH = 3.6 pour donner une masse pectique stable à température ambiante. (photo 10).
- ✓ Le milieu PDA préparé à base de P.O₁ (à raison de 20 g/l) présente une texture ferme et stable à pH = 3.37.
- ✓ Le milieu G.N additionné de P.O₁ (40g/l) solubilisé par HCl 4 N présente une masse solide à pH = 3.11.

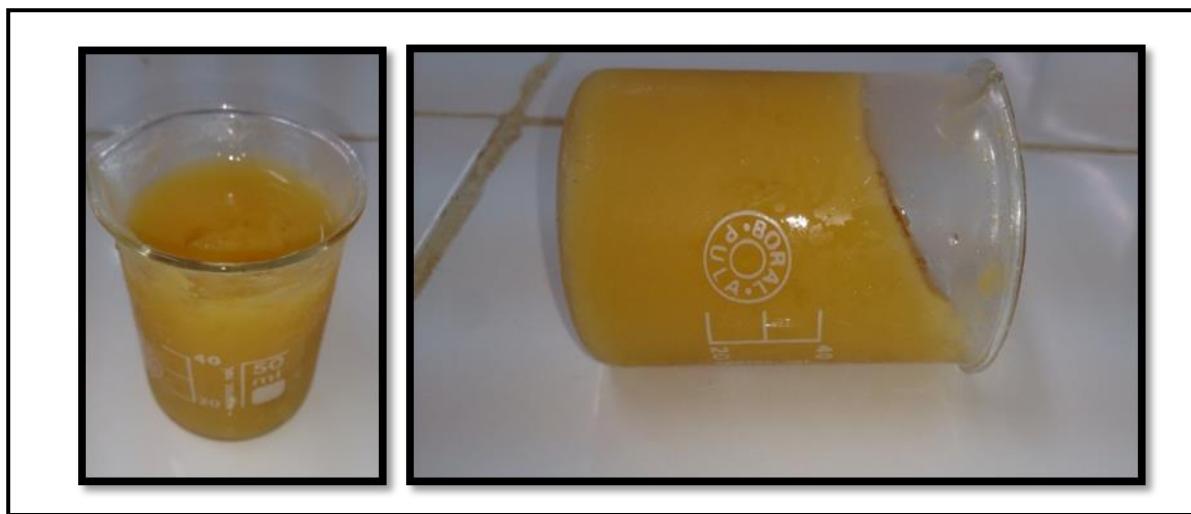


Photo 9 : Milieu M.S gélifié par la P.O₁.



Photo 10 : Milieu M.S gélifié par la P.P₁.

III. Texture et consistance de la gelée de pectines :

La masse pectique obtenue suite à la gélification du milieu de culture sous l'action de la pectine représente une texture ferme (très semblable à la texture d'une gélose commune). La formation obtenue présente une dureté plus au moins réduite en la comparant avec celle rencontrée pour les milieux de culture à base d'agar agar. La structure obtenue est instable contre l'autoclavage, légèrement cassante, et susceptible d'expulser une quantité importante d'eau (planche 8).

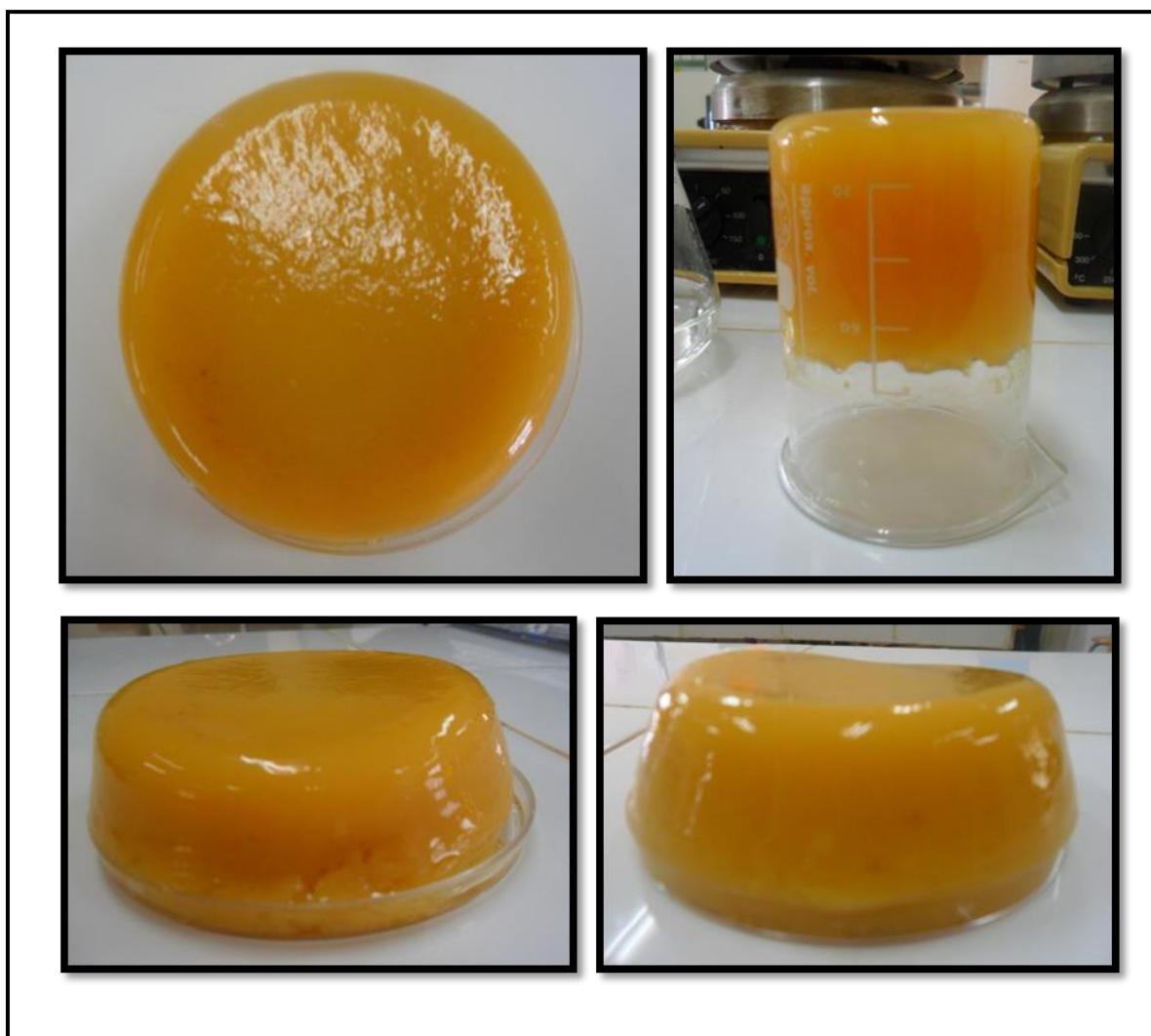


Planche 8 : Aspect visuel de la gelée obtenu après gélification.

Discussion générale

V. DISCUSSION GENERALE

Le présent travail avait essentiellement pour but, d'incorporer les pectines extraites à partir des déchets de fruits (valorisés), pour leur propriétés épaississantes, stabilisantes et surtout gélifiantes. Pouvant ainsi, probablement, remplacer l'Agar agar (extrait d'algues rouges) pour la confection des milieux de culture *In vitro* (en agissant comme un agent de texture).

Les rendements en pectine obtenus varient d'une espèce à l'autre. On a obtenu un rendement moyen de 34 % pour la P.O₁ contre 08 % pour la P.P₁ (même si l'extraction est faite dans les mêmes conditions expérimentales). Ces variations sont attribuées à la composition de la M.P ayant servie pour l'extraction de la P.P₁ (marcs de pommes) dont la partie centrale a été retenue incluant les pépins et une partie de la pulpe entourant ces derniers, ce qui conduit à déduire le pourcentage réduit des composants pariétaux entrant dans la composition des marcs de pommes. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus par baïssisse (2009), dont un rendement de 35.71 % est enregistré pour la P.O dans les mêmes conditions expérimentales (avec une différence légère de 1.71 %) contre un rendement bien meilleur enregistré pour la P.P (20.06 %) d'où une différence de 12.06% est enregistrée.

Ces variations sont liées à plusieurs paramètres. Les prétraitements semblent avoir des effets plus au moins remarquables sur la dégradation des protopectines, kejbets et *al* (1976) ont rapporté une dépolymérisation intense au cours du blanchiment. Les enzymes polygalacturonases sont stables à 50-70 ° C, mais réactivées au delà de ces températures (**Lo et al., 2002**). Cette hypothèse confirme les essais dont nous avons effectué sur un zeste d'oranges, directement séché après la séparation (sans procéder à un prétraitement), dont le rendement obtenu est aux alentours de 42 %.

D'autres facteurs peuvent influencer la libération de pectines à partir de la protopectine, notamment le diamètre des particules de la matière première, dont Sahari et *al* (2003) ont rapporté qu'un diamètre de particule de 0,075 mm est optimum pour la pulpe d'orange égyptienne destinée à l'extraction des pectines.

L'utilisation du chlorure d'aluminium (AlCl), pour la précipitation semble donner de meilleurs rendements pour les marcs de pommes, d'où un rendement de 27,7 % a été enregistré par Baïssisse (2009), soit un surplus de 7.64 %.

La P.O₂ extraite par la 2^{ème} méthode (à pH neutre, 100 °C – 120 min), affiche un rendement très modeste en le comparant avec celui obtenu pour la P.O₁ ce si est associé à l'absence de l'agent HCl (même si le temps et la température favorisent un meilleur rendement). Le pH de 1.5 utilisé pour la première procédure (**Kratchanova et al., 2004**), obtenu par de HCl permet la rupture des liaisons chimiques, la solubilisation ainsi de la protopectine et d'avoir un meilleur rendement par conséquent, ajoute l'auteur. Cette hypothèse confirme partiellement le faible rendement qu'offre la 2^{ème} procédure (1.4 % pour la P.O₂ et un rendement quasiment nul pour la P.P₂). S'ajoute à ca l'utilisation, pour la méthode citée, de l'éthanol comme étant agent de précipitation, dont plusieurs travaux révèlent que son efficacité s'avère moins importante par rapport aux sels à base d'aluminium en matière de rendement (**Attri et Maini., 1995 ; Dennapa et al., 2006**).

Les conditions expérimentales retenues pour les deux méthodes d'extraction suggèrent que les fractions de pectines obtenues sont des pectines Hautement Méthylées (HM), partant des résultats communiqués par Hachem (2014), Hachem et *al* (2015), et Baississe (2009), dont l'extraction est faite par de l'eau chaude. Cependant l'extraction à chaud en milieu acide (1^{ère} méthode) permet l'obtention d'une fraction pectique dont le degré de méthylesterification est aux alentours de 60% d'après les résultats communiqués par Diligent (2010), ce degrés de méthylation, est strictement contrôlé par le pH, la température, et la durée du traitement acide ajoute l'auteur. Aubree (2002) rapporte que les pectines ainsi obtenues présentent un DM compris entre 55 % et 75 %, cependant Baississe (2009) l'estime entre 60% et 75 % pour ces travaux. Ce degré de méthylation fait l'objet d'un facteur déterminant sur les conditions de gélification du milieu de culture visé, influe également le Processus et le mécanisme d'association des pectines dans la formation des gels (**Agnan et al., 2010**), s'ajoutent à ca le pH, la concentration en sucre ou en acide, la présence des chaines latérales et la température (**Capel et al., 2006 ; Guillotin et al., 2007**).

La fraction pectique obtenue par la 2^{ème} méthode (P.O₂), Présente une faible solubilité, dont la solubilisation (au cours de la reconstitution) a été effectué en milieu neutre. Ces conditions simulent c'elles ayant servies pour son extraction. L'addition progressive du saccharose au milieu a augmenté d'avantage la viscosité de la solution. Le sucre agit comme agent déshydratant (abaissement de l'AW), favorisant le rapprochement des chaînes et donc l'établissement des liaisons hydrogènes. Toutefois, seules, les liaisons hydrogènes ne sont pas suffisantes pour contribuer à l'énergie nécessaire à la gélification. Aussi, il a été admis l'existence d'interactions hydrophobes entre les groupes méthoxyles, interactions essentielles

à la formation du réseau (**Oakenfull et Scott, 1984**). Le rôle du sucre dans la formation du gel est de stabiliser les zones de jonctions en favorisant les interactions hydrophobes.

Le pH acide est nécessaire pour la formation du gel en présence du sucre, ce qui explique l'absence d'une gélification efficace pour la P.O₂.

La solubilisation des fractions pectiques obtenues par la 1^{ère} méthode (P.O₁ et P.P₁) n'est achevée qu'en milieu acide (pH moyen = 1.57), dans une solution chauffée à plus de 80°C. Ces conditions sont très comparables à celles ayant servies pour sa première solubilisation (en cours de l'extraction). Pour ces deux fractions en solution, les groupes carboxyles de la chaîne de pectine sont sous forme ionique COO⁻, D'une part les pectines sont donc fortement hydratées, les molécules d'eau se tiennent à la chaîne par des liaisons hydrogène et par des associations ion-dipôles. D'autre part, les pectines chargées identiquement se repoussent, les chaînes sont dispersées dans la solution (**Diligent., 2010**). à un pH de gélification, L'affinité de chaînes polymères pour l'eau est réduite. Les molécules de pectine ne se repoussent plus puisqu'elles ne sont plus chargées, C'est la gélification. En plus des liaisons hydrogène qui s'établissent, certaines régions du polymère en chaînes se collent ensemble. A cause de la présence de molécules comme le L-rhamnose, Ces chaînes permettent d'éviter la précipitation qui aurait lieu si les chaînes de polymères s'associaient à toute la longueur (**Diligent., 2010**). Les valeurs de pH enregistrées pour les meilleurs essais retenus (3.01, 3.11, 3.37 . . .) confirment partiellement le phénomène décrit par le même auteur pour un pH de 3.3, cependant Rolin et Devaries (1990) préconisent un pH minimal de 3.5.

Le gel (Milieu de culture – Pectine HM), formé présente une texture plus au moins rigide, dans les conditions de gélification citées (partie résultats). Cette texture bien qu'elle soit très semblable à celle rencontrée pour les milieux de culture *In-vitro*, reste impropre à l'utilisation optimale dans les milieux de culture. Elle dépend simultanément et strictement de plusieurs paramètres dont la maîtrise simultanée semble très difficile pour le contexte opté. la structure obtenue pour le cas de pectines étudiée est jugée "tartinable" conformément aux résultats communiqués par Lanoiselé (2007), S'ajoute à ça La nécessité de l'incorporation d'une grande quantité de sucre (avec un pH < 3), limitant donc, les ingrédients entrant en composition. La grande quantité de sucre primordiale pour la gélification (Ralet et al., 2005 imposent un maximum de 55% de saccharose soit plus de 500 g/l contre un maximum de 30 g/l pour le milieu M.S), conduit à un déséquilibre osmotique pouvant affecter la stabilité et la

viabilité des germes destinés à être ensemencés sur la gélose prévue avec cette fraction pectique, servant comme agent de texture (gel acide et sucré).

De même la force du gel et le pH de la gélification varient en fonction du DM de la pectine impliquée dans le gel faisant ainsi la difficulté de la détermination des conditions optimales pour l'obtention d'une consistance suitable.

L'étroitesse de la gamme de pH susceptible de transformer cette classe de pectines en état de gel (**Lanoisellé., 2007**), révèle l'incompatibilité du gel obtenu (par gélification des pectines HM), vis- à vis un très grand nombre de cellules bactériennes, fongiques, somatiques en raison de ces données limitant strictement les germes pouvant pousser ultérieurement sur la gélose confectionnée. Les données précédentes incluent les pH attribués aux milieux de culture *In-vitro*, et qui sont minutieusement et strictement sélectionnés.

Dans l'industrie agroalimentaire, Les conditions de gélification strictes que les pectines HM imposent, ont été à l'origine d'un revirement vers les pectines LM (plus « tolérantes » en termes d'extrait sec et de pH). La gélification par tastement que présente cette classe de pectines de chaîne, peut assez bien être décrite par le modèle de la boîte à œufs. L'ion calcium joue un rôle-clé, puisque c'est autour de lui que va se dessiner la "boîte à oeufs" modèle de configuration retenu. Il joue donc en quelque sorte le rôle de ciment entre les deux chaînes concernées. Les pectines LM recourent au même mécanisme, avec participation, donc, des ions Ca^{2+} , cependant que les pectines HM, elles, donnent lieu au même phénomène en milieu acide (**Aubree., 2002 ; Lanoisellé., 2007 ; Agnan et al ., 2010**).

La texture du gel résultant de la coagulation du milieu par des pectines LM est du type “cassant”, comparable à celui obtenu pour l'Agar-agar (ce qui révèle une forte rigidité). La réaction entre le Ca^{2+} et les pectines FM doit être lente pour l'obtention d'un gel au lieu d'un précipité, ajoute Thibault et *al* (2000).

Le caractère thermoréversibles constituent un cas technologique intéressant faisant la compatibilité probable des pectines LM, puisque l'on pourra obtenir les produits par dispersion à chaud, la gélification se produisant au refroidissement, par addition de Ca^{2+} . La variété des gammes de pH, la consistance du gel obtenu, suite à la stabilité de la formation “Boite à œuf” encore appelée “Egg box” et la thermo réversibilité font de cette classe de pectine, une alternative envisageable à promouvoir pour la conception des milieux de culture *In vitro*, tout en valorisant les déchets de fruits.

*Conclusion
et
perspectives*

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude en cours opte à reproduire la composition fréquente, des milieux de culture *in-vitro*, tout en essayant d'incruster un agent de texture séparé et purifié, à partir des déchets de fruits (parties impropre à la consommation humaine) faisant ainsi l'objet d'une valorisation des ces derniers. La substance visée à savoir : la pectine est extraite à partir des écorces d'oranges (zeste), et des marcs de pommes.

Les résultats expérimentaux, tirés de l'extraction des pectines, à partir des sources testées pour la présente expérimentation, suggèrent un meilleur rendement obtenu dans un milieu acidifié ($\text{pH} = 1.5$) à 80°C , comparablement à l'extraction thermique à l'eau chaude 100°C . Dans le même contexte, la 1^{ère} méthode affiche un rendement de 34 %, et 08% pour le Zo et les Mc respectivement, contre les 1.4% et des traces négligeables qu'affiche la 2^{ème} méthode.

La Pec résultante de la 2^{ème} méthode (P.O_2) présente une faible solubilité en milieu neutre, ainsi qu'un faible pouvoir gélifiant, même en présence massive de saccharose. Cependant les fractions pectiques obtenues par la 1^{ère} méthode ($\text{P.P}_1/\text{P.O}_1$) présentent une solubilité quasiment négligeable pour le milieu neutre, se solubilisent parfaitement dans un pH d'environ 1.57, et forment des gels de texture admissible pour un pH compris entre 2.60 et 2.85.

A la lumière des résultats obtenus il s'avère que la gelée obtenue, par coagulation des milieux de culture testés sous l'action des pectines (hautement méthyles suivant les données ainsi communiquées), malgré sa consistance, considérablement proche de celle en vigueur, demeure impropre à la culture *in-vitro* : cette structure se forme dans des conditions de gélification strictes, en dehors des quelles, elle perd ces caractéristiques, ce qui fait son instabilité à l'incubation, dans les températures importantes, dans les milieux humides (telque les coliformes fécaux – 44°C / milieu humide), ainsi qu'à l'autoclavage (120°C / 20 minutes). Cette structure limite strictement le pH du milieu de culture (acidophiles), et est soumise aux risques de dégradation sous l'action des enzymes pectolitiques d'origine microbienne.

Une perte massive des solutés (nutriments, macro éléments, microéléments, vitamines ...), est susceptible, en raison de la perte d'eau remarquée pour la formation obtenue.

Pour conclure, il est intéressant de noter que la grande variété des classes pectiques, des mécanismes et des paramètres, conduisant à la gélification de ces dernières, font de ces

molécules un agent de texture intéressant à promouvoir ultérieurement, dans le contexte étudié pour cela notre modeste étude préconise :

- ❖ La détermination précise des divers composés polysaccaridiques, entrant dans la formation des chaînes de la variété de pectines étudiée, les proportions massiques de chaque composant, et permettre ainsi la précision du degré de méthylation. Ce dernier représente le paramètre le plus primordial entrant dans le mécanisme de la gélification, et des caractéristiques du gel formé.
- ❖ L'adoption des variétés de pectines présentant des conditions de gélification simulant c'elles caractérisant les milieux de culture ciblés : les pectines LM présentent un cas technologiquement intéressant en raison de leur « tolérance » vis-à-vis le pH et le taux de sucre au cours de la gélification (sous réserve d'une quantité suffisante de calcium). Ces variétés permettent une texture thermoréversible très semblable à celle obtenue avec de l'Agar-agar.
- ❖ La combinaison des pectines avec d'autres agents de texture permettant ainsi de pousser davantage la gélification du milieu de culture et l'atteinte ainsi de la fermeté préconisée pour une bonne croissance/développement.

Enfin, les données de la présente étude doivent être validées par des quantités plus importantes.

Références bibliographiques

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Agnan M M C., Aguedo M., Paquot M., 2010.** Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2011. 15(1), 153-164.
- **Ajmal M., Rao R.A.K., Ahmad R., Ahmad J., 2000.** Adsorption studies on Citrus reticulata (fruit peel of orange): removal and recovery of Ni(II) from electroplating wastewater. Journal of Hazardous Materials., 79, (1-2), 117-131.
- **Aruoma O.I., Landes B., Ramful-Baboolall D., Bourdon E., Neergheen-Bhujun V., Wagner K.-H., Bahorun T., 20012.** Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. Preventive Medicine., 54, (Supplément), S12-S16.
- **Aspinall G.O., Kessler G., 1957.** The structure of callose from te grape vine, Chemistry and Industy, 1296.
- **Attri B.L., Maini S.B. 1996.** Pectin from G algal (Citrus Pseudolimon Tan) peel. Bioresource Technology, 55: 89-91.
- **Aubree M E., 2002.** Mécanismes de gélification des pectines - 5ème Colloque de l'Alliance 7 / CEDUS : La texture des produits sucrés.
- **Baïssisse S., 2009.** Extraction et appréciation des pectines a partir d'écorces d'oranges de pulpe d'abricots et de pommes. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de magistère en sciences agronomiques. Univ d'el Hadj Lakhdar – Batna.
- **Balat M., Balat H.,Öz C., 2008.** Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science., 34, (5), 551-573.
- **Baldan B., Bertoldo A., Navazio L.,&Mariani P.,2003..** Oligogalacturonide-induced changes in the developmental pattern of Daucus carota L. somatic embryos. Plant Sci., 165, 337-348.
- **Balkeose D., Baltacioglu H., 1992.** Adsorption of heavy metal cations from aqueous solutions by wool fibers. Journal of Chemical Technology and Biotechnology.,54, 393-397.
- **Basso M.C., Cerrella E.G., Cukierman A.L., 2002.** Lignocellulosic materials as potential biosorbents of trace toxic metals from wastewater. Chemical Resources., 41,3580-3585.
- **Bédouet L., Courtois B. & Courtois J, 2003.** Rapid quantification of o-acetyl and o-methyl residues in pectin extracts. Carbohy. Research, 338: 379-383

- **Bhushan S., Joshi, V.K., 2006.** Baker's yeast production under fed batch culture from apple pomace. Journal of Scientific and Industrial Research., 65, 72-76.
- **Bidlack J., Malone M., Benson R., 1992.** Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, Proceedings of the Oklahoma Academy of Science, , 72, 51-56.
- **Borycka B., Zuchowski J., 1998.** Metal sorption capacity of fibre preparations from fruit pomace. Polish-Journal-of-Food-and-Nutrition-Sciences., 7, (48), 67-76.
- **Capel F., et al., 2006.** Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. Food Hydrocolloids, 20, 901-907.
- **Castaldo J.E., Reed Iii J.F., 2008.** The lowering of vascular atherosclerotic risk (LOVAR) program: An approach to modifying cerebral, cardiac, and peripheral vascular disease. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases., 17, (1), 9-15.
- **Cech D., 2012.** Prevention of osteoporosis: From infancy through older adulthood. Hong Kong Physiotherapy Journal., 30, (1), 6-12.
- **Chauhan D., 2005.** A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. Cancer Res., 65(18), 8350-8358.
- **Cheftel J.C., Cheftel H., 1978.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol I. Techniques et documentation –Entreprise Moderne. Paris, PP 147-236.
- **Collins A.R., 2005.** Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. European Journal of Cancer., 41, (13), 1923-1930.
- **Constenla D., Lozano J.E., 2003.** Kinetic model of pectin demethylation. Latin American Applied Research, 33:91-96.
- **Crop Energies. F.O, 2011** Licht's World Ethanol and Biofuels Report..
- **Darvill A.G., Albersheim P., Mc Neil M., Lau J.M., York W.S., Stevenson T.T., Thomas J., Doares S., Gollin D.J., Chelf P., Davis K., 1985.** Structure and function of plant cell wall polysaccharides, Journal of Cell Science (Suppl.), , 2, 203-217.
- **Dennapa B., Kamonrad R. & Hataichanoke N., 2006.** Extraction and physicochemical characteristics of acid-soluble pectin from raw Papaya
- **Dennapa B., Kamonrad R., Hataichanoke N., 2006.** Extraction and physicochemical characteristics of acid-soluble pectin from raw Papaya (*Carica Papaya*) peel. Chiang Mai
- **Diligent M., 2010.** Les confitures : de l'art aux techniques. Mémoires de l'Académie Nationale de Metz – 2010.

- **Doi T., Matsumoto H., Abe J., Morita S,2010.** Application of rice rhizosphere microflora for hydrogen production from apple pomace. International Journal
- **Dongwski G., Lorenz A. & Proll J., 2002.** The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. J. Nutr., 132, 1935-1944.
- **Dumville J.C., Fry S.C., 2000.** Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. Plant Physiol. Biochem., 38(1/2), 125-140
- **Elmaleh S., Defrance M.B., Ghommidh C,1999.** Organic acids oxidation by *Candida utilis*: application to industrial waste water treatment. Process Biochemistry., 35,441-449.
- **Fanaro S., 2005.** Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 41(2), 186-190.
- **FAOSTAT –Division.** Statistique de l'Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=fr#ancor>. (consulté le 05.05.2012).
- **Feng X., Wang H., Wang Y., Wang X., Huang J,2010.** Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge. International Journal of Hydrogen Energy., 35, (7), 3058-3064.
- **Ferrari C.K.B., 2007.** Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. Maturitas., 58, (4), 327-339.
- **Fishman M.L., Chau H.K., Hoagland P.D., Hotchkiss A.T., 2006.** Microwave-assisted extraction of lime pectin. Food Hydrocolloids, in press.
- **Ford E.S., Mokdad A.H., 2001.** Fruit and Vegetable Consumption and Diabetes Mellitus Incidence among U.S. Adults. Preventive Medicine., 32, (1), 33-39.
- **Gnanasambandam R., Proctor A., 2000.** Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. Food Chemi.,68: 327-332.
- **Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., 2002.** Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor L.*, Phytochemistry, , 60, 89-97.
- **Grohmann K., Baldwin E., Buslig B., 1994.** Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Biochemistry and Biotechnology., 45-46, (1), 315-327.

- **Grohmann K., Baldwin E.A., Buslig B.S., Ingram L.O.N., 1994.** Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of Escherichia coli. Biotechnology Letters., 16, (3), 281-286.
- **Guillotin S., 2005.** Studies on the intra –and intermolecular distribution of substituents in commercial pectins. PhD. thesis Wageningen University, ISBN 90-8504-265-8.
- **Guillotin S.E., et al. 2007.** RapidHPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl- esterification and amidation. Food Hydrocolloids, 21, 85-91.
- **Gupta, V.K., Ali I., 2000.** Utilisation of bagasse fly ash (a sugar industry waste) for the removal of copper and zinc from wastewater. Separation and Purification Technology. 18, (2), 131-140.
- **Hachem K., 2014.** Extraction, dosage, analyse biochimique et structurale des polysaccharides pariétaux de l'Arganier Argania spinosa (L.). Valorisation dans la biosorption du Plomb et du Cadmium. Thèse en vue d'obtention du diplôme de docteur en sciences. USTOMB.
- **Hachem K., Labani A., Kaid-Harche M., 2015.** Isolation, Structural Characterization, and Valorization of Pectic Substances from Algerian Argan Tree Leaves (Argania spinosa (L.) Skeels). International Journal of Polymer Science- Volume 2015 (2015), Article ID 868747.
- **Herbstrieth., Fox ., 1998.** Chances and limits for the use of pectin as emulsifier. Corporate Group. Turnstraße 37. 75305 Neuenbürg/Württ. Germany,1-14.
- **Himour S., 2008.** étude comparée de régénération de plants par voie végétative en culture in vitro. Thèse de magistère .univ. mentouri-constantine. 5: 24-29.
- **Hotchkiss A.T., 2003.** Pectic oligosaccharides as prebiotics. ACS Symp. Ser., 849, 54-62.
- **Ishii T. et al., 1999.** The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self assembles into a covalently cross-linked dimer. J. Biol. Chem., 274(19), 13098-13104. J.Sci., 33 (1):129-135.
- **Jackson C.L., 2007.** Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. Glycobiology, 17(8), 805-819.
- **Jiang C.-M., Lai Y.-J., Lee B.-H., Chang W.-H., Wu M.-C. & Chang H.-M., 2002.** Changes in physico-chemical properties of pectin form jelly fig (Ficus awkeotsang Makino) seeds during extraction and gelling. Food Research International 35: 31-35.
- **Johnson D.L , 1969.** Cyclic amine oxides as solvents for natural and synthetic polymers, Brit., pp 9.

- **Joshi V.K., Sandhu D.K, 1996.** Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology*, 56, (2-3), 251-255.
- **Keen R., 2007.** Osteoporosis: strategies for prevention and management. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 21, (1), 109-122.
- **Kratchanova M., Palvlova E., Panchev I., 2004.** The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56 (2):181-185.
- **Kumar M., Mazeaud I., Gebert M., DodgeT., 2003.** Biopolymers: Health, Cosmetic & Food Applications. Proceedings: Conferences Abstracts. PP 14-27.
- **Lacroix M., Marcotte M., Ramaswamy H.S., 2003.** Irradiation of Fruits, Vegetables, Nuts, and Spices, in Handbook of postharvest technology. Cereals, fruits, vegetables, tea, and spices, Chakraverty, A., Mujumdar, A.S., Vijaya Raghavan, G.S., Ramaswamy, H.S. Marcel Dekker, Inc., New York, Etats Unis d'Amérique.
- **Lanoiselé E., 2007.** Rhéologie et qualité des produits agro-alimentaires - 3.6. les agents épaississants et gélifiants de nature glucidique .P 97 -118.
- **Levigne S., Ralet M.-C., Thibault J.-F., 2002.** Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohy. Polym.*, 49(2):145-153.
- **Lianeza Coalla H., Blanco Fernández J.M., Morís Morán M.A., López Bobo M.R., 2009.** Biogas generation apple pulp. *Bioresource Technology*, 100, (17), 3843-3847
- **Link A., Balaguer F., Goel A, 2010.** Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80, (12), 1771-1792.
- **Lo Scalzo R., Forni E., Lupi D., Giudetti G., Testoni A., 2002.** Changes of pectic composition of 'Annurca' apple fruit after storage. *Food Chem.* 93:521–530.
- **Lopes Da Silva J. A., Rao M.A., 2006.** Pectins: structure, functionality, and uses. In food polysaccharides and their applications, Second Edition. Taylor & Francis Group, LLC, pp 353-411.
- **Lopes Da Silva J. A., Rao M.A., 2006.** Pectins: structure, functionality, and uses. In food polysaccharides and their applications, Second Edition. Taylor & Francis Group, LLC, pp 353-411.

- **Lozano J.E., 2006.** Fruit manufacturing. Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance., Springer Science and Business Media, LLC, New York, Etats Unis d'Amérique.
- **Manderson K., 2005.** In vitro determination of the prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacture by-product stream. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12), 8383-8389
- **Maranon E., Sastre., H., 1992.** Ion-exchange equilibria of heavy metals onto chemically modified apple residues. *Solvent Extraction and Ion Exchange.*, 9, (3), 516-523.
- **Marfà V., 1991.** Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *Plant J.*, 1(2), 217-225.
- **Martin-Moreno J.M., Soerjomataram I., Magnusson G., 2008.** Cancer causes and prevention: A condensed appraisal in Europe in. *European Journal of Cancer*.
- **May C. D., 2000.** Pectins.In Phillips G.O. and Williams P.A. (Eds). *Handbook of Hydrocolloïds*. Cambridge : wood head Publishing, pp169-188.
- **Mc Cormick C.L., Shen T.C., 1981.** A new cellulose solvent for preparing derivatives under homogenous conditions, *Organic Coatings and Plastics Chemistry*, , 45, 335-338.
- **McCready R.M., 1970.** Pectin, methods in food analysis. Joslyn M.A. (2 Ed.). Academic
- **Messiaen J., Van Cutsem P.,1994.** Pectic signal transduction in carrot cells: membrane, cytosolic nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol.*, 35, 677-689.
- **Mirmiran P., Noori N., Zavareh M.B., Azizi F., 2009.** Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolism.*, 58, (4), 460-468.
- **Moletta R., 2009.** Le traitement des déchets, Lavoisier, Paris.
- **Mollet J.C., 2006.** La paroi primaire végétale, *Habilitation à Diriger les Recherches*, Université d'Artois, pp 121
- **Multon J .L., 2002.** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. *Sciences et Techniques Agroalimentaires*, 3eme édition, Londres, Paris – New York ,746p.
- **Murto M., Björnsson L., Mattiasson B,2004.**Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management.*, 70, (2), 101-107.

- **Mussatto S.I., Mancilha I.M., 2007.** Non-digestible oligosaccharides: a review. Carbohydr. Polym., 68, 587-597.
- **Namasivayam C., Kadirvelu K., 1999.** Uptake of mercury (II) from wastewater by activated carbon from an unwanted agricultural solid by-product: coirpith. Carbon., 37, (1), 79-84.
- **Nigam, P.S., Singh A., 2011.** Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress in Energy and Combustion Science., 37, (1), 52-68.
- **O'Neill M., Albersheim P., Darvill A., 1990.** The pectic polysaccharides of primary cell walls, Methods in plant biochemistry, academic press london, , 415-441.
- **Oakenfull J.G., SCOTT A.G., 1985.** Food technology in Australia, 37 (4) 156. of Hydrogen Energy., 35, (14), 7369-7376.
- **Olano-Martin E., Gibson G.R., Rastall R.A., 2002.** Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. J. Appl. Microbiol., 93, 505-511
- **Olano-Martin E., Williams M.R., Gibson G.R., Rastall R.A., 2003.** Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit Escherichia coli O157:H7 shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. FEMS Microbiol. Lett., 218, 101-105
- **Parlement Européen., 2008.** Directive 2008/98/CE du Parlement Européen et du Conseil du 19 novembre 2008 relative aux déchets et abrogeant certaines directives (Texte présentant d'intérêt pour l'EEE). Journal Officiel de l'Union européenne., L, (312), 3-30
- **Patle, S., Lal B., 2007.** Ethanol production from hydrolysed agricultural wastes using mixed culture of Zymomonas mobilis and Candida tropicalis. Biotechnology Letters.,
- **Paul D., Ohlrogge K., 1998.** Membrane separation processes for clean production. Environmental Progress., 17, (3), 137-141
- **Paulsen B.S., Barsett H., 2005.** Bioactive pectic polysaccharides, Advances Polymers Sciences, , 186, 69-10
- **Pérez.S., Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T.A., 2003.** complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, Biochimie, , 85, 109-121.
- **Perrone P. et al., 2002.** Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. Phytochemistry, 60, 67-77.

- **Pirmohammadi R., Rouzbehan Y., Rezayazdi K., Zahedifar M, 2006** Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. Small Ruminant Research., 66, (1-3), 150-155.
 - **Plateforme Biocarburants , , 2014.** La situation des bioacrburants dans l'Union Européenne. La production de bioéthanol. <http://www.biofuels-platform.ch/infos/eu-bioethanol.php>. (Consulté le 01.11.2014).
- Press .New-York and London, pp565-599.
- **Qaiser S., Saleemi A.R., Ahmad M.M., 2007.** Heavy metal uptake by agro based waste materials. Environmental Biotechnology., 10, 409-416.
 - **Qiang X., Yonglie C., Qianbing W., 2009.** Health benefit application of functional oligosaccharides. Carbohydr. Polym., 77, 435-441.
 - **Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., 2002.** Pectins. Dans : Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, , 12, 345-380.
 - **Ralet M.-C., Bonnin, E., Thibault J.-F., 2001.** Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. Journal of Chromatography B, 753, 157–166
 - **Ralet M.C., Cabrera J.C., Quéméner B., Bonnin E., Thibault J.F., 2005.** Mapping sugar beet pectin acetylation pattern .Phytochemi., 66:1832-1843.
 - **Rastall R.A., Maitin V., 2002.** Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Curr. Opin. Biotechnol., 13,490-496.
 - **Ridley B.L., O’Neil M.A., Mohnen D., 2001.** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, Phytochemistry, 57, 929-967.
 - **Robert D., Roland J.C., 1998.** Biologie végétale, volume 1, Organisation cellulaire, Ed. Doin, Paris, , pp 367.
 - **Rodriguez-Carjaval M.A., Du Penhoat C.H., Mazeau K., Doco T., Pérez S., 2003.** The three dimensional structure of mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer : a combined molecular modeling and NMR investigation, Carbohydrate research, , 338, 651-671.
 - **Roland J.C., 1980.** Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural. Dans : Les Polymères Végétaux. Polymères Pariétaux et Alimentaires non azotés. Ed. Gauthier-Villars, Paris, 30-45

- **ROLIN C., DE VRIES J.A.,** 1990. Food gels, Harris P ed, Elsevier, London, New York, p 401-434.
- **Sahari M A., Akbarian A.M., Hamed M. 2003.** Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin. *Food Chemi.*, 83:43-47.
- **Schaub, S.M., Leonard J.J., 1996.** Composting: An alternative waste management option for food processing industries. *Trends in Food Science & Technology.*, 7, (8), 263-268.
- **Schiewer S., Patil S.B., 2008.** Pectin-rich fruit wastes as biosorbents for heavy metal removal: Equilibrium and kinetics. *Bioresource Technology.*, 99, (6), 1896-1903.
- **Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D., Voragen A.G.J., 1995.** A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin, *Carbohydrate Research.*, , 279, 265-279.
- **Schols H.A., Verhuis E., Bakx E.J., Voragen A.G.J., 1995.** Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohyd. Res.*, 275: 343-360.
- **Sharma B.R., Naresh L., Dhuldhoya N.C., Merchant S.U., Merchant U.C., 2006.** An overview on pectins. *Times Food Processing Journal*, India, pp 44-51.
- **Sharma N., Kalra K., Oberoi H., Bansal S., 2007.** Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. *Indian Journal of Microbiology.*, 47, (4), 310-316.
- **Sjöström E., Westermark U., 1999.** Chemical composition of wood and pulps : basic constituents and their distribution, In: Sjöström E., Alén R. (eds), *Analytical Methods in wood chemistry, pulping, and papermaking*. Springer series in wood sciences, 1-19.
- **Skuladottir H., Tjoenneland A., Overvad K., Stripp C., Olsen J.H., 2006.** Does high intake of fruit and vegetables improve lung cancer survival? *Lung Cancer.*, 51, (3), 267-273.
- **Soerjomataram I., Oomen D., Lemmens V., Oenema A., Benetou V., Trichopoulou A., Coebergh J.W., Barendregt J., de Vries E., 2010.** Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected european countries. *European Journal of Cancer.*, 46, (14), 2563-2580.
- **Souto-Maior J.F.A., Reis A.V., Pedreiro L.N., Cavalcanti O.A., 2010.** Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polym. Int.*, 59, 127-135.

- **Souty M., Breuils L., André P ., 1981.** Etude des possibilités d'affermissement par les sels de calcium de la texture des oreillons d'abricots appertisés. *Sci. des Alim.*, 1(2): 266-282.
- **Sriamornsak P., 2003.** Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. Pp 206-228.
- **Srilatha H.R., Nand K., Babu K.S., Madhukara K., 1995** Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane. *Process Biochemistry.*, 30, 327-331.
- **Stabnikova O., Wang J.-Y., Bo Ding H., Joo, H., 2005.** Biotransformation of vegetable and fruit processing wastes into yeast biomass enriched with selenium. *Bioresource Technology.*, 96, (6), 747-751.
- **Steinmetz K.A., Potter J.D., 1996.** Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review. *Journal of the American Dietetic Association.*, 96, (10), 1027-1039.
- **Sud, D., Mahajan G., Kaur M.P., 2008.** Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions - A review. *Bioresource Technology.*, 99, (14), 6017-6027.
- **Suzuki T., 2002.** Preparation and isolation of oligogalacturonic acids and their effects in cockscomb (*Celosia argentea L.*) seedlings. *J. Plant Growth Regul.*, 21, 209-215.
- **Swennen K., Courtin C.M., Delcour J.A., 2006.** Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Food Sci. Nutr.*, 46, 459-471.
- **Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K., 1997.** Chemistry and uses of pectin a review, *Critical reviews in food science and nutrition*, , 37(1), 47-73.
- **Thibault J. F., Renard C.MG.C., Axelos M.A.V., Bonnin E., 2000.** Les pectines. INRA, Centre de Recherché Agro-alimentaire, B.P., 71627,44316 Nante Cedex 03.
- **Thibault J.F ., 1980.** Les pectines, Dans : Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés, Ed Gauthier-Villars, Paris, 232-251
- **Thibault J.-F., Renard C.MG.C., Axelos M.A.V., Bonnin E., 2000.** Les pectines. INRA, Centre de Recherché Agro-alimentaire, B.P., 71627,44316 Nante Cedex 03.
- **Thomas J.R., Darvill A.G., Albersheim P., 1989.** Rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide that is a component of monocot cell walls, *Carbohydrate Research*, , 185, 279-306.
- **Thompson A.K., 2010.** Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. Second edition., CAB International, Oxford, Angleterre.

- **Tucker G.A., Mitchell J., 1993.** Cell walls, structure, utilisation and manipulation, Plant Biotechnology, , 55-103.
- **Van Cutsem P. & Pino Cabrera J.C., 2008.** Composition comprising oligogalacturonans and polycationic saccharides. WO 2008/065151 A1.
- **van Heerden I., Cronje C., Swart S.H., Kotze J.M., 2002.** Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. Bioresource Technology., 81, 71-76.
- **Vierling, E., 2008.** Aliments et boissons. Filières et produits., Vélyz : Doin Bordeaux : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, France.
- **Vijayaraghavan K., Ahmad D., Soning C., 2007.** Bio-hydrogen generation from mixed fruit peel waste using anaerobic contact filter. International Journal of Hydrogen Energy., 32, (18), 4754-4760.
- **Villas-Bôas S.G., Esposito E., de Mendonça M.M., 2003.** Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology., 19, (5), 461-467.
- **Vinson, J.A., 2006.** Oxidative stress in cataracts. Pathophysiology, 13, (3), 151-162.
- **Visser J., Voragen A.G.J., 1996.** Pectins and pectinas .In Progress in Biotechnology .Vol. 14. Elsevier Science B.V. Amsterdam –Lausanne –New York –Oxford –Shamno Tokyo. pp 715.
- **Wang H., Wang J., Fang Z., Wang X., Bu H., 2010.** Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. International Journal of Hydrogen Energy., 35, (15), 8303-8309.
- **Wilkins M., Suryawati L., Maness N., Chrz D., 2007.** Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. World Journal of Microbiology and Biotechnology., 23, (8), 1161-1168.
- **Wilkins M.R., 2009.** Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy, 33, (3), 538-541.
with type 2 diabetes mellitus. Journal of the American Dietetic Association., 111, (10), 1536-1542.
- **Worrall J.J., Yang C.S., 1992.** Shiitake and Oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. HortScience., 27, (10), 1131-1133.
- **Xie J.Z., Chang H.-L., Kilbane J.J., 1996.** Removal and recovery of metal ions from wastewater using biosorbents and chemically modified biosorbents. Bioresource Technology., 57, (2), 127-136.

- **Yapo B., 2007.** Etude de la variabilité structurale des pectines. Thèse de doctorat .France.
- **Yapo B.M., Koffi K.L., 2006.** Yellow passion fruit rind-a potential source of low – methoxyl pectin .Sci .et Technol. des aliments, In press.
- **York W.S., Darvill A.G., MC Neil M., Stevenson T.T., Albersheim P., 1986.** Isolation and characterization of plant cell walls and cell components, Methods in Enzymology, , 118, 3-40.
- **Zandleven J., Sorensen S.O., Harholt J., Beldman G., Schols H.A., Scheller H.V., Voragen A.J., 2007.** Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of Arabidopsis thaliana, Phytochemistry, , 68(8), 1219-26.
- **Zhu Y., Zhang Y., Ling W., Feng D., Wei X., Yang C., Ma J., 2011.** Fruit consumption is associated with lower carotid intima-media thickness and C-reactive protein levels in patients.

Annexe

Annexe 1 : Préparation et composition des milieux de cultures

I. Milieu M.S

I.1. Constituants du milieu M.S (Murashige et Skoog). (Himour, 2008).

	Ingredients	Solution mère Mg/l	Volume de Prélèvement ml	
Macroéléments	NH4NO3	1650		
	KNO3	1900		
	CACL2.2H2O	440	50	A
	MgSO4.7H2O	370		
	KH2PO4	170		
Microéléments	MnSO4.H2O	22.3		
	ZnSO4.7H2O	8.6		
	H3BO3	6.2	10	B
	KI	0.83		
	Na2MoO4.2H2O	0.25		
	CuSO4.5H2O	0.025		
	CoCl2.6H2O	0.025		
Fe-EDTA	Na2EDTA	37.3	10	
	FeSO4.7H2O	27.8		C
Vitamines et acides amines	Ingrédients	Solution mère	Volume de	
		Mg/100ml	Prélèvement	
	Glycine	0.2		
	Acide	0.5	10ml	D
	Nicotinique	0.5		
	Pyridoxine.HCl	0.1		
	Thiamine HCl	100		
Sucre	Myo-inositol			
	Saccharose	30000Mg/L	30000mg	E
Agar	Agar	8g/l	8g	F

(A, B, C, D,E, F) volume de prélèvement de solutions mère.

La préparation de la solution nutritive MS se fait comme suit :

I.2.. Préparation de la solution mère de macro-éléments

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués en tableau 1(A), en chauffant légèrement au besoin.
- Transférer la solution dans un flacon de 1L et compléter à 1L avec de l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

I.3. Préparation de la solution mère de micro-éléments

La préparation de la solution mère consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués en tableau 1 (B) en chauffant légèrement au besoin.
- Transférer la solution dans un flacon de 1litre et compléter à 1litre avec l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

I.4. Préparation de la solution mère de Fe-EDTA

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Ajouter quelques gouttes de NaOH et chauffer jusqu'à ébullition.
- Couper la source de chaleur.
- Ajouter le Na₂EDTA et mélanger jusqu'à dissolution.
- Ajouter FeSo₄-7H₂O.
- Transférer la solution dans un flacon de 1litre et compléter à 1L avec de l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

I.5. Préparation du milieu de culture

A partir de la solution mère dont la préparation est citée ci dessus, on a pu préparer la solution finale, avec les concentrations exigées (Tableau 1). Selon le protocole suivant :

- Verser approximativement 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Peser et dissoudre le saccharose en chauffant légèrement au besoin.
- Ajouter le volume nécessaire de macroéléments, microéléments, FE-EDTA.
- Ajuster le pH à $5,7 \pm 0,1$ avec HCl (1N) ou NaOH (1N).
- Compléter à 1L avec l'eau distillée.
- Chauffer puis ajouter l'Agar graduellement jusqu'à ce que le milieu devienne clair.

II. Milieu GN (Gélose Nutritive)

Gélose nutritive

Extrait de levure.....	2 g
Extrait de viande.....	10 g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	20g
Nacl.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml
Agar agar.....	20g

II. PDA (Potatoes Dextrose agar)

Eplucher, laver et couper en petits morceaux 200 g de pomme de terre, les mettre dans 700 ml d'eau distillée et porter à ébullition, après filtrer et compléter à 1 litre.

Dextrose (ou saccharose).....	10 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Résumé

La présente étude bute essentiellement à valoriser les sous produits provenant des fruits (marcs de pommes, zeste d'oranges), pour la synthèse des milieux de culture *in-vitro*, tout en essayant de substituer l'Agar-agar, pour la gélification du milieu.

Les résultats de l'extraction des pectines, à partir des sources testées, affichent un meilleur rendement obtenu dans un milieu acidifié à pH = 1.5 - 80°C, d'où un rendement de 34 %, et 08% pour le Zo et les Mc respectivement contre 1.4% et des traces négligeables pour l'extraction à l'eau chaude (100°C).

La Pectine résultante de la 2^{ème} méthode (P.O₂) présente une faible solubilité en milieu neutre, ainsi qu'un faible pouvoir gélifiant, Cependant c'est elle obtenue par la 1^{ère} méthode (P.P₁/P.O₁), se solubilise parfaitement à pH = 1.57, et forme des gelées de texture admissible pour un pH compris entre 2.60 et 2.85. Vue les conditions de gélification qu'imposent les pectines extraites, le milieu ainsi obtenu est jugé impropre à la croissance des cellules en culture.

Mots clé : Sous produits, milieux de culture *in-vitro*, Agar- agar, Pectines, Gélification, gelée.

Abstract

The current study aims for valorizing the by-products resulting from fruits (Apple pomace, orange zest), in synthesis of *in-vitro* culture mid, by trying to substitute Agar-agar, for the jellification of the mid.

The results of pectin extraction, from the tested sources in an acid middle in with pH = 1.5 – 80°C , shows a better yield of which an output of 34%, and 08% are obtained for the apple pomace and orange zest respectively, versus an output of 14% and negligible results that extraction by ardent water (100°C) shows.

The pectin resulting from the 2nd process (P.O₂), has low solubility in a neutral solution, and shows an unpleasant gelling power, thus the pectin obtained by the 1st process (P.P₁/P.O₁), is perfectly solubilized in a pH = 1.57, making an admissible jelly in pH between 2.60 and 2.85. because of the conditions in which the jelly is formed, the mid is judged inadequate for the *in-vitro* cells development.

Key words : By-products, *in-vitro* culture mid, Agar-agar, pectin, jellification, jelly.

ملخص

تهدف الدراسة الجارية، أساساً إلى تثمين المنتجات الجانبية الناتجة عن الفواكه المستهلكة (نفل التفاح، قشور البرتقال)، في ترکيب محلول الزرع، المخصص للزراعة الإختبارية، وذلك باستبدال مكون الأجار-آجار لتخثير محلول. النتائج المتحصل عليها فيما يخص استخلاص البكتينات من المواد المدروسة في محلول حامضي ذو درجة pH = 1.5 - 80 °، مكنت من الحصول على مردود 34 و 08 بالنسبة لنقل التفاح و قشر البرتقال على الترتيب، مقابل مردود 1.4 و آثار ضئيلة يمكن إهمالها بالنسبة لاستعمال الماء الساخن (100°م). البكتينات الناتجة عن الإجراء الثاني (P.O₂)، تمثل قدرات ضعيفة على التحلل في الوسط المعندل و كذا تكثيف محلول، في حين أن تلك الناتجة عن الإجراء الأول (P.P₁/P.O₁) تتحلل بشكل جيد في الوسط الحامضي pH = 1.57 مع تكون خثارة ذات صلابة مقبولة في درجة pH ما بين 2.60 و 2.85. نظراً للشروط التي تتحذ فيها البكتينات المستخلصة، حالة خثارة يمكن الفصل في عدم توافقها مع تطور الخلايا المزروعة.

الكلمات المفتاحية : المنتجات الجانبية، محلول الزرع المخصص للزراعة الإختبارية، الأجار-آجار، البكتينات، تخثير، خثارة