

UNIVERSITE DE NGAOUNDERE

*Ecole Nationale Supérieure des
Sciences Agro-Industrielles*

THE UNIVERSITY OF NGAOUNDERE

*National School of Agro-Industrial
Sciences*



DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES ET D'INGENIERIE

DEPARTMENT OF PROCESS ENGINEERING

UNITE DE FORMATION DOCTORALE GENIE DES PROCÉDES

**Liquéfaction d'une pulpe de goyave à chair blanche (*Psidium guajava*
Linn) par les pectinases industrielles d'*Aspergillus niger* et
clarification du jus par centrifugation**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT/Ph.D.** en Sciences de l'Ingénieur

Mention : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Alimentaire et Bioprocédés

Par

NINGA KOMBELE Aimé

Master en Sciences et Technologie en Génie des Procédés

Matricule : 08I032EN

Jury:

ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	Université de Yaoundé I	Président – Rapporteur
TAVEA Frédéric Marie	Maître de Conférences	Université de Douala	Rapporteur
TCHATCHUENG Jean Bosco	Maître de Conférences	Université de Ngaoundéré	Rapporteur
KAYEM Joseph	Maître de Conférences	Université de Ngaoundéré	Examineur
NSO Emmanuel JONG	Professeur	Université de Ngaoundéré	Directeur
DESOBGO ZANGUE Steve C.	Maître de Conférences	Université de Ngaoundéré	Directeur

Année académique 2020/2021

DEDICACE

A

Mes Parents

REMERCIEMENTS

Nous remercions tous ceux qui de près ou de loin nous ont aidé à la réalisation de ce travail, nous pouvons citer entre autres :

- ✓ Le Dieu Tout-Suffisant (El Shaddaï) et mon Seigneur, Sauveur et Grand-Frère Jésus-Christ pour sa grâce d'écrire ces mots et qui a toujours été présent, accomplissant sa volonté au travers de cette thèse ;
- ✓ Madame le Recteur de l'Université de Ngaoundéré, pour la mise en place d'une politique de formation universitaire répondant aux besoins du monde professionnel et la création d'un environnement adéquat à la promotion de l'excellence académique et le rayonnement de cette institution à l'échelle nationale et internationale ;
- ✓ Notre Directeur de thèse, Pr NSO Emmanuel JONG, qui n'a point failli à son devoir durant tout le déroulement de cette thèse. Son encadrement a commencé lors du projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur en Industries Agricoles et Alimentaires et celui visant l'obtention du Diplôme de Master en Sciences et Technologies en Génie des Procédés. Son encadrement sans relâche a permis de comprendre cette étude qui n'était qu'à l'état embryonnaire. Son soutien sur tous les plans a également été noté ;
- ✓ Notre Co-directeur, Pr DESOBGO ZANGUE Carly Steve, pour le suivi sans relâche durant tout le déroulement de cette thèse. Sa disponibilité en tout temps a été impressionnante. L'ardeur et la rigueur dont il a fait preuve dans l'appréhension de tous les aspects de cette recherche ont permis de donner plus d'explications aux phénomènes observés ;
- ✓ A l'organisation The World Academy of Sciences (TWAS – DBT) pour la bourse de mobilité qui a permis le déplacement pour l'Inde où l'essentiel de la phase expérimentale de cette thèse a été fait. Elle a apporté son soutien financier durant tout le séjour en Inde et a permis l'intégration dans la communauté scientifique internationale ;
- ✓ Le superviseur à l'Institut Indien de Technologie de Kharagpur en Inde, le Professeur Sirshendu DE, pour l'accueil dans son laboratoire de séparation membranaire, et pour l'encadrement durant toute la phase expérimentale de cette thèse. Il a facilité une meilleure intégration dans son équipe de recherche et m'a permis de bénéficier d'un séjour agréable en Inde, malgré ses multiples occupations ;

- ✓ Le Responsable de l'Unité de Formation Doctorale, Pr KAYEM Joseph, qui n'a ménagé aucun effort pour un déroulement harmonieux des études de Master et Doctorat dans l'Unité de Formation Doctorale Génie des Procédés. Il a également apporté une contribution significative dans l'étude du dimensionnement de la centrifugeuse-décanteuse continue ;
- ✓ Le Chef du Département de Génie des Procédés, Pr KOFA Guillaume, qui a aidé dans la programmation des séminaires relatifs à cette thèse ;
- ✓ Tous les enseignants du Département de Génie des Procédés pour leur soutien et leur présence à tous les séminaires relatifs à cette thèse ;
- ✓ Tout le staff administratif et le corps enseignant de l'ENSAI qui ont œuvré corps et âme pour que les différents cursus de formation puissent se dérouler dans des conditions convenables ;
- ✓ Dr SAGU TCHEWONPI Sorel, Dr MAKATA TAGA Cybèle, Dr NGUEMOGNE Annick Chancelle, Dr KAMENI NGOUNOU Michel, Madame MOUTO KALLA Liliane, Monsieur EKORONG AKOUAN ANTA Junior Franck, Monsieur EGBE Daniel EGBEMBANG, Madame MAKEBE Calister WINGANG, Madame WIYEH Claudette BAKISU MUALA, Madame ACHA Anna AFFECK que nous avons rencontrés au cours de notre parcours au Département de Génie des Procédés et d'Ingénierie et qui nous ont apporté leur soutien ;
- ✓ Tous les étudiants et personnel du Laboratoire de Séparation Membranaire du Département de Génie Chimique de l'Institut Indien de Technologie de Kharagpur.
- ✓ Tous les membres du groupe Technology Evangelical Union pour l'aide multiforme (spirituelle, financière, académique et matérielle) dans le campus de l'IIT Kharagpur. Il s'agit entre autres de : Pr Chacko JACOB et sa famille, Pr Retna RAJ et sa famille, Dr Jacob KOSHY, Amulya Aphya PALLE, Monisha PERLI, Dr Richard Noel MERRIT, Philip JACOB, Dr Victor Avisek CHATTERJEE, Dr Aliba AO, Dr Dineshkumar RAMALINGAM, Dr BELLA NKE Bertille Edith, Dr Jebishia THOMAS ROSELET, Joshua EBENEZER, Reena JOSEPH ;
- ✓ Toute ma famille qui m'a toujours soutenu sur tous les plans, particulièrement mon grand frère PILO Ernest, ma grande sœur DENG BOUBA Rébecca.
- ✓ A Mme NGO MBONG Marie Madeleine pour son soutien et ses appuis divers.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Production moyenne de la goyave à chair blanche entre 2015 et 2017 selon les régions et les pays.....	4
Tableau 2: Composition et valeur nutritionnelle de la goyave	9
Tableau 3: Modèles de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la pectine dans le jus de goyave à chair blanche générés pour chaque concentration en enzyme	72
Tableau 4 : Cahier de charges des réponses ou paramètres physicochimiques	101
Tableau 5 : Combinaison des facteurs ou conditions opératoires répondant aux critères du cahier de charges.....	124
Tableau 6 : Plages optimales des paramètres de dépectinisation enzymatique de la goyave	125
Tableau 7: Caractéristiques géométriques du rotor R – 236 M	142
Tableau 8 : Caractéristiques des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes commerciales recensées dans la bibliographie.....	148
Tableau 9 : Valeurs des constantes des modèles log-normal pour l'ajustement du spectre granulométrique, du coefficient de détermination et de l'analyse des variances pour chaque échantillon de jus clarifié de goyave.....	159
Tableau 10: Débits d'alimentation calculés pour chacune des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes commerciales.....	181

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : (A) Photo du goyavier en floraison, (B) Photo des fruits verts sur le goyavier	6
Figure 2 : Schéma simplifié du procédé de fabrication de la purée et du jus de goyave à chair blanche (Wu <i>et al.</i> , 2005).....	10
Figure 3: Représentation schématique de la structure primaire de la pectine (Source : Minzanova <i>et al.</i> , 2018).....	16
Figure 4: Représentation schématique de la structure de l'acide galacturonique (a) et de l'homogalacturonane (b) (Source : Sriamornsak, 2003).....	17
Figure 5: Mode d'action de la PME (Salas-Tovar <i>et al.</i> , 2017).....	22
Figure 6: Représentation schématique du mécanisme catalytique des glycosyl hydrolases de la famille 28 (Source : van Hansen <i>et al.</i> , 1999).....	26
Figure 7: Hydrolyse de la chaîne de pectate par des polygalacturonases (PG). (Source : www.worthlington-biochem.com).....	26
Figure 8: Représentation schématique du mécanisme de coopérativité/allostérie à interaction séquentielle pour une enzyme disposant de quatre sites de fixation. (Source : Marangoni, 2003).	33
Figure 9: Représentation schématique du modèle à symétrie concertée pour une enzyme allostérique à deux sites de fixation du substrat. (Source : Marangoni, 2003).	34
Figure 10: Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à bol tubulaire (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).	41
Figure 11: Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à bol à chambres concentriques. (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).....	43
Figure 12 : Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à axe vertical et à racloir (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie)	44
Figure 13: Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à axe horizontal et à racloir (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie)	45

Figure 14: Représentation schématique des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes. (a) à bol plein ; (b) à bol autodébourbeur à ouverture par piston ; (c) à bol à buses ou à embouchures (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).	48
Figure 15: Représentation schématique d'un décanteur centrifuge continu à vis racleuse (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).	49
Figure 16: Représentation schématique du décanteur centrifuge continu à tamis. (Source : Perry's Chemical Engineers' Handbook).....	50
Figure 17 : Images de la goyave à chair blanche du cultivar Lucknow 49.....	52
Figure 18: Cinétique de dégradation enzymatique de la pectine commerciale	64
Figure 19 : Mécanisme réactionnel de libération d'une unité de l'acide galacturonique	67
Figure 20: Effet du temps de contact enzyme-substrat et de la concentration d'enzyme sur le taux d'hydrolyse	70
Figure 21: Modélisation de la cinétique réactionnelle décrite par les pectinases pour différentes concentrations en enzyme	72
Figure 22: Représentation schématique du mécanisme de la cinétique de Hill. (a) le mécanisme de la coopérativité et (b) le mécanisme d'allostérisme.	75
Figure 23: Représentation schématique des mécanismes d'attaque simple (a) et de processivité (b) pouvant avoir lieu sur un sous-site de pectinase d' <i>A. niger</i> avec un substrat à extrémité réduite. 80	
Figure 24: Effet de la concentration en enzyme sur la valeur du coefficient de Hill	83
Figure 25: Représentation schématique du phénomène d'affinité des substrats avec les sites de fixation.....	84
Figure 26: Effet de la concentration en enzyme sur la valeur de V_{max}	87
Figure 27: Structure chimique du radical libre DPPH• (Nithya et Madhavi, 20017).....	98
Figure 28: Viscosité apparente du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	103
Figure 29: Teneur en acide galacturonique du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	105
Figure 30: pH du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de traitement enzymatique	109

Figure 31: Conductivité électrique en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	112
Figure 32: Liaison de deux chaînes de l'acide galacturonique non méthylé en présence de calcium : Le calcium bivalent peut se lier à 9 oxygènes électronégatifs et assurer ainsi la liaison entre 2 chaînes de pectine. Source : Bekhouche (2006)	113
Figure 33: Teneur en Sucres Solubles du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée	114
Figure 34: Couleur du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	115
Figure 35: Teneur en polyphénols du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	119
Figure 36: Teneur en protéines du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	121
Figure 37: Capacité antioxydante du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée.....	123
Figure 38: Images FESEM de la purée de goyave à chair blanche sans aucun traitement enzymatique : (a) et (b) Agrandissement de 15000 et 45000 respectivement	126
Figure 39: Images FESEM des échantillons de jus de goyave. (I), (II), (III) et (IV) Images des échantillons de goyave à chair blanche ayant subi un traitement enzymatique avec 0,033% m/m, 0,055% m/m, 0,078% m/m et 0,100% m/m de concentration en enzyme, respectivement.....	128
Figure 40 : Représentation tridimensionnelle (A) du rotor de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique et (B) d'un disque d'une centrifugeuse à assiettes (Alpha Laval).....	140
Figure 41: Image du rotor R – 236M (A) et de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique (B)	141
Figure 42 : Rendement en jus de goyave à chair blanche en fonction de la Force Centrifuge Relative appliquée.....	151
Figure 43: Granulométrie moyenne des particules des jus clarifiés en fonction des paramètres de centrifugation.....	153
Figure 44: Répartition granulométrique des particules du jus brut de goyave à chair blanche (non centrifugé).....	155

Figure 45: Répartition granulométrique des particules de jus clarifiés de goyave. (a), (b), (c), (d) et (e) jus de goyave à chair blanche centrifugés aux accélérations et temps de centrifugation indiqués.....	156
Figure 46: Surface du spectre granulométrique des particules en fonction des paramètres de centrifugation.....	158
Figure 47: Limpidité du jus clarifié de goyave à chair blanche en fonction des paramètres de centrifugation.....	161
Figure 48: Teneur en pectine du jus clarifié de goyave à chair blanche en fonction des paramètres de centrifugation.....	165
Figure 49: Teneur en protéines du jus clarifié de goyave à chair blanche en fonction des paramètres de centrifugation.....	168
Figure 50: Teneur en sucres solubles totaux du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.....	170
Figure 51: Teneur en acide galacturonique du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.....	171
Figure 52: Teneur en matière sèche du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.....	172
Figure 53 : pH du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.....	173
Figure 54: Conductivité électrique du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.....	174
Figure 55 : Performance de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique pour les accélérations centrifuges 1343g, 2388g et 3731g.....	176
Figure 56: Variation du " <i>grade efficiency</i> " en fonction de la granulométrie des particules pour les échantillons clarifiés à 1343g.....	179
Figure 57: Probabilité en fonction de la granulométrie des particules pour les centrifugeuses-décanteuses continues à disques.....	182

LISTE DES ABREVIATIONS

- BSA : Bovine Sérum Albumine
- CA : Capacité Antioxydante
- DP : Degré de polymérisation
- DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyle)
- [E] : Concentration en enzyme
- FCR : Force Centrifuge Relative
- FESEM : Field Emission Scanning Electron Microscopy
- GalA ou AG : Acide galacturonique
- HG : Homogalacturonane
- PE : Pectine Estérase
- PET : Polyéthylène téréphtalate
- PG : Polygalacturonase
- PGI, PGII, PGA et PGD : Isoformes I, II, A et D de la Polygalacturonase
- PGIP : Polygalacturonase Inhibitor Protein
- PME : Pectine méthylestérase
- PPO : Polyphenol Oxydase
- PVC : Polyvinyl Chlorure
- RG : Rhamnogalacturonane
- [S] : Concentration en substrat ou en pectine
- TH : Taux d'hydrolyse
- TSS : Total Soluble Solids ou Sucres solubles Totaux
- USAID : United States Agency for International Development
- USDA: United States Department of Agriculture
- UV : Ultraviolet
- V et Vmax : Vitesse initiale de la réaction et Vitesse maximale de la réaction

SOMMAIRE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
RESUME	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.1 La goyave.....	4
1.1.1 Origine et distribution	4
1.1.2 Description botanique	5
1.1.3 Ecologie et culture	6
1.1.4 Composition chimique et valeur nutritionnelle.....	8
1.1.5 Utilisations	10
1.2 LES PECTINES.....	12
1.2.1 Structure de la pectine.....	12
1.2.2 Les modifications des pectines pendant le mûrissement de fruits et légumes	17
1.2.3 Propriétés et Utilisations des pectines.....	18
1.3 LES PECTINASES.....	19
1.3.1 La pectine estérase (PE) ou Pectine méthyl estérase (PME)	21
1.3.2 Les polygalacturonases (PG)	24
1.3.3 APPLICATIONS DES PECTINASES.....	28

1.4 QUELQUES NOTIONS SUR LA CINETIQUE ENZYMATIQUE	30
1.4.2 La cinétique michaélienne	30
1.4.3 La coopérativité et l'allostérie ou allostérisme	32
1.5 LA CENTRIFUGATION	37
1.5.1 Définition	37
1.5.2 La sédimentation gravitaire.....	37
1.5.3 La sédimentation centrifuge.....	39
1.5.4 Les différents types de centrifugeuses-décanteuses continues	39
CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA CINETIQUE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE LA PECTINE COMMERCIALE ET DE LA PECTINE DE GOYAVE	50
RESUME DU CHAPITRE	50
2.1 INTRODUCTION	51
2.2 MATERIEL ET METHODES.....	52
2.2.1 Matériel biologique.....	52
2.2.2 METHODES	53
2.3 RESULTATS ET DISCUSSION	63
2.3.1 Modélisation de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la pectine commerciale....	63
2.3.2 Modélisation de la cinétique de dégradation enzymatique de la pectine du jus de goyave	69
.....	84
.....	84
2.4 CONCLUSION PARTIELLE	88

CHAPITRE 3 : EFFET DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DU JUS DE GOYAVE A CHAIR BLANCHE	89
RESUME DU CHAPITRE.....	89
3.1 INTRODUCTION	90
3.2 MATERIEL ET METHODES.....	91
3.2.1 Matériel biologique.....	91
3.2.2 METHODES.....	91
3.3 RESULTATS ET DISCUSSION	102
3.3.1 Effet des paramètres de traitement enzymatique sur la viscosité	102
3.3.2 Effet des paramètres de traitement enzymatique sur la teneur en acide galacturonique	105
3.3.3 Effet des conditions opératoires sur d'autres caractéristiques du jus de goyave	109
3.4 Analyse des échantillons par la Microscopie électronique à balayage à émission de champ	125
3.4 CONCLUSION PARTIELLE	130
CHAPITRE 4 : CLARIFICATION DU JUS DE GOYAVE À CHAIR BLANCHE PAR UNE CENTRIFUGEUSE DE LABORATOIRE A ROTOR CONIQUE ET CARACTERISATION D'UNE CENTRIFUGEUSE-DECANTEUSE CONTINUE A ASSIETTES	132
RESUME DU CHAPITRE.....	132
4.1 INTRODUCTION	133
4.2 MATERIEL ET METHODES.....	134
4.2.1 Matériel biologique.....	134
4.2.2 Méthodes.....	134

4.3 RESULTATS ET DISCUSSION	150
4.3.1 Effet des paramètres de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave	150
4.3.2. Détermination des caractéristiques dimensionnelles et opérationnelles d'une centrifugeuse continue à assiettes	175
4.4 CONCLUSION PARTIELLE	183
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	189
ANNEXES	207

RESUME

L'objectif de ce travail était de dépectiniser la purée de goyave à chair blanche (*Psidium guajava*) par des pectinases industrielles d'*Aspergillus niger* et de clarifier par centrifugation le jus dépectinisé de goyave. L'approche méthodologique a consisté à déterminer le mécanisme de dégradation enzymatique de la pectine de goyave à chair blanche ; à déterminer l'effet de la concentration en pectinase et du temps de contact enzyme-purée sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation ; à déterminer l'effet du temps et de l'accélération centrifuge sur les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche ; et enfin à identifier les conditions d'opérations de quelques centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes. Il ressort de ce travail que la cinétique de dégradation de la pectine commerciale décrit un profil hyperbolique de type michaélien. Les paramètres cinétiques K_M et V_{max} sont respectivement de 1148,50 mg/L et 0,017 $\mu\text{mol/mL/min}$. Un taux d'hydrolyse de la pectine de goyave à chair blanche supérieur à 77,70% a été obtenu avec les concentrations enzymatiques de 0,055% m/m, 0,078% m/m et 0,100% m/m. La cinétique de dégradation de la pectine de la goyave à chair blanche décrit un profil sigmoïdal et le coefficient de Hill (n) diminue de 7 à 4 avec la concentration en enzyme du fait de l'existence des phénomènes de processivité, d'inhibition de certaines isoformes par le substrat/produits de la réaction. La vitesse maximale V_{max} augmente avec la concentration en enzyme de 60 à 280 mg/L/min. Le traitement enzymatique entraîne une augmentation considérable de la teneur en acide galacturonique, de la couleur, et de la teneur en sucres solubles totaux. La viscosité apparente du jus de goyave à chair blanche diminue considérablement dès la troisième minute de traitement, mais la diminution est beaucoup moins importante après et ce jusqu'à la 90^{ième} minute. Le pH, les teneurs en protéines et polyphénols diminuent au cours du traitement ; alors que la capacité

antioxydante n'est pas affectée par le traitement enzymatique. Au cours du traitement, il se produit une diminution de la granulométrie des particules, une augmentation de la proportion de la phase liquide et une amélioration de l'homogénéité du mélange telle qu'observées sur les images photographiques. La centrifugation a permis d'obtenir plus de 90% m/m de jus de goyave. Elle entraîne une diminution de la surface des courbes de répartition granulométrique des particules et aussi de la granulométrie moyenne, de la teneur en matière sèche, de la conductivité électrique, des teneurs en protéines, et en pectine. La limpidité des échantillons de jus de goyave à chair blanche et la teneur en sucres solubles totaux augmentent au cours de la centrifugation ; mais aucun effet considérable n'est observé tant sur la teneur en acide galacturonique et que sur le pH. A l'exception du jus de goyave à chair blanche centrifugé pendant 10 min à 1343g (3000 rpm), une différence de moins de 10% a été observée entre le taux de clarification obtenu pour différentes forces centrifuges : 1343g, 2388g (4000 rpm) et 3731g (5000 rpm). Les limites de séparation particulière pour des échantillons de 1343g sont 2669, 2200 et 1783 nm, correspondant à 20, 30 et 40 min de traitement respectivement. Les débits d'alimentation des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes pour 1343g ont été déterminés. Pour ces centrifugeuses, les seuils de coupure ou granulométries équiprobables (x_{50}) pourraient être de 1887, 1556, 1261 nm, pour 20, 30 et 40 min, respectivement.

ABSTRACT

The main objective of this thesis was to liquefy a white flesh guava puree (*Psidium guajava*) with industrial pectinases from *Aspergillus niger* and to clarify by centrifugation the enzymatically treated juice. The methodological approach consisted in, determining enzymatic guava pectin depectinization mechanism; determining the effect of enzymatic treatment on the physicochemical parameters of the juice; determining the effect of time and centrifugation speed on the physicochemical parameters of the clarified juice; and, identifying operation conditions of some potential disc stack centrifuges. These are the following outputs of this work. The depectinization kinetics of commercial pectin exhibits a hyperbolic trend which fits the Michaelis-Menten model. Kinetic parameters are K_M , 1148.50 mg/L and V_{max} , 0.017 μ mol/mL/min. The degree of guava pectin hydrolysis greater than 77.70% was obtained for 0.055% w/w; 0,078% w/w and 0.100% w/w enzyme concentrations. For each enzyme concentration, guava pectin depectinization kinetics exhibits a sigmoidal trend and the Hill coefficient (n) decreases from 7 to 4 with an increase in enzyme concentration owing to the processivity mechanism, inhibition of some isoforms by their substrate/products. The maximum velocity V_{max} increases from 60 to 280 mg/L/min with an increase in enzyme concentration. Enzymatic treatment leads to significant increase in galacturonic acid and total soluble solid content, as well as the color of samples. Apparent viscosity drops drastically in the first 3 min of treatment followed by a weak decay, up to 90min. pH values, protein and polyphenol content decrease during treatment; but no significant effect on antioxidant capacity was observed. Electron Microscope Images of samples revealed that particle size decreased during treatment; whereas more liquid appeared and the homogeneity of the mixture improved. Centrifugation enabled the recovery of more than 90% w/w of juice. It also led to a decrease in surface of particle size distribution curves and the mean size, the dry matter content,

the electric conductivity, and the protein and pectin contents. Clarity and total soluble solid content of samples increased during centrifugation. No significant effect on pH and galacturonic acid content was observed. Apart from the juice centrifuged within 10 min at 1343g (3000 rpm), a 10% difference was observed between clarification efficiency obtained at 1343g, 2388g (4000 rpm) and 3731g (5000 rpm). The particle separation limits for juices at 1343g were 2669, 2200 and 1783 nm, for 20, 30 and 40 min, respectively. Feed flowrates of continuous disc stack centrifuges for 1343g were determined. For those centrifuges, estimated cut-off sizes (x_{50}) were 1887, 1556 and 1261 nm, for 20, 30 and 40 min, respectively.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La goyave à chair blanche (*Psidium guajava*) est un fruit du goyavier, plante cultivée en zones tropicales et subtropicales avec une production mondiale en 2014 estimée à environ 6,2 millions (USAID, 2014). La valeur nutritive de la goyave, son goût, ses vertus thérapeutiques dues aux composés phénoliques qu'elle renferme et leur capacité antioxydante, les teneurs élevées en vitamines C et A lui confèrent une place importante dans le classement des fruits. La teneur en vitamine C de la goyave à chair blanche est au moins quatre (4) fois celle de l'orange. Les appellations de « Super – fruit » et de « Pomme des tropiques » lui ont été attribuées (Nag *et al.*, 2011, Surajbhan *et al.*, 2012 ; Ali *et al.*, 2014). Elle est un fruit climactérique fortement périssable qui a une durée de vie d'environ 3 à 4 jours après mûrissement lorsqu'elle est maintenue à la température ambiante. Elle est le plus souvent consommée à l'état frais, mais peut également être transformée en plusieurs autres produits dérivés tels que la confiture, la gelée, la poudre, les conserves de fruits, le concentré de goyave, la purée, le nectar, mais également le jus de goyave à chair blanche (Wu *et al.*, 2005). La fabrication de ce dernier et d'autres produits dérivés liquides nécessite l'obtention au préalable d'une purée qui contient plusieurs particules en suspension et des scléroïdes (granulats) qui la rendent dense, trouble et épaisse (Wu *et al.*, 2005). A ces particules et granulats s'ajoutent des macromolécules telles que la pectine, la cellulose, l'hémicellulose, la lignine.

La pectine est un polysaccharide relativement complexe, de structure hétérogène, négativement chargée et acide (Jayani, Saxena et Gupta, 2005 ; Prasanna, Prabha et Tharanathan, 2007). Sa masse moléculaire élevée, son degré de méthylation et la présence dans sa structure de plusieurs groupements hydroxyles lui confèrent une capacité élevée de rétention d'eau, avec pour conséquence une valeur relativement élevée de la viscosité du jus de goyave. Elle provoque

l'encrassement et le colmatage de la membrane de filtration au cours de la clarification du jus avec pour conséquence la diminution du rendement en jus (Lee *et al.*, 2006). L'hydrolyse de la pectine est indispensable. Celle-ci peut se faire entre autre par voie enzymatique. La teneur en pectine de la goyave à chair blanche fraîche est comprise entre 0,77 et 0,99 % en base humide, tandis que celle de la purée fraîche est comprise entre 0,26 et 1,2% m/m (Prasanna *et al.*, 2007 ; Combo, Aguedot et Paquot, 2011).

Les pectinases sont les enzymes qui hydrolysent les macromolécules de pectine. Elles peuvent être d'origine végétale, bactérienne ou fongique ; cette dernière étant la plus préférée pour les applications industrielles. Pour des raisons d'efficacité et des critères d'acceptabilité dans l'industrie agro-alimentaire, les pectinases d'*Aspergillus niger* sont les plus utilisées (Gummadi et Panda, 2003). Le jus issu du traitement enzymatique de la purée a une viscosité apparente et une teneur en pectine plus faibles, facilitant ainsi l'opération de clarification (Lee *et al.*, 2006). Ces propriétés technologiques ont été exploitées dans plusieurs travaux de la bibliographie concernant le jus de goyave à chair blanche (Nso *et al.*, 1998 ; Kaur *et al.*, 2009 ; Kaur *et al.*, 2011 ; Suradjbahan *et al.*, 2012 ; Le *et al.*, 2012 ; Akesowan et Choonhahirun, 2013 ; Nguyen *et al.*, 2013 ; Marcelin *et al.*, 2017). Dans la majorité de ces travaux, la dépectinisation a été couplée à la clarification par centrifugation qui s'est faite à une vitesse et un temps fixes. Il en a résulté une augmentation ou une diminution plus ou moins considérable des paramètres physicochimiques du jus à l'issue de la dépectinisation. Sur le plan phénoménologique, le mécanisme moléculaire de la dépectinisation enzymatique de la purée de goyave n'a pas été décrit par ces équipes de recherche. Sur le plan technologique, la détermination de l'effet du temps et de l'accélération centrifuge sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche et les performances de clarification des centrifugeuses de laboratoire n'a pas été faite par ces chercheurs. De plus, les

travaux ne décrivent pas la prédiction de la performance de centrifugation du jus de goyave à chair blanche d'une centrifugeuse-décanteuse continue à partir de celle des centrifugeuses de laboratoire utilisées. L'objectif général de ce travail était de dépectiniser la purée de goyave à chair blanche (*Psidium guajava*) cv Lucknown – 49 par les pectinases industrielles d'*Aspergillus niger* et de clarifier le jus de goyave à chair blanche par centrifugation. Il s'est agi spécifiquement de :

- Déterminer le mécanisme de dépectinisation enzymatique de la purée de goyave à chair blanche avec pour hypothèse : l'hydrolyse enzymatique de la pectine de goyave à chair blanche n'obéit pas au mécanisme classique de Michaelis Menten ;

- Déterminer l'effet de la concentration en pectinases et du temps de contact enzyme-purée sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation avec pour hypothèse : les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation dépendent de la concentration en pectinases et du temps de contact enzyme-purée ;

- Déterminer l'effet du temps et de la force de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche avec pour hypothèse : les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche dépendent des conditions de centrifugation ;

- Identifier les caractéristiques opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue à partir de la performance d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique avec pour hypothèse : le taux de clarification du jus de goyave à chair blanche par une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique fixe les limites de fonctionnement d'une centrifugeuse-décanteuse continue.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 La goyave

1.1.1 Origine et distribution

La goyave à chair blanche est un fruit originaire de l'Amérique Centrale et du Sud du Mexique. Les explorateurs espagnols ont amené la goyave à chair blanche aux Philippines et les portugais l'ont disséminée des Philippines jusqu'en Inde. Elle est actuellement cultivée dans les parties tropicales et subtropicales du monde sur presque tous les types d'habitat comme l'un des fruits les plus utilisés dans le monde (Wu *et al.*, 2005). Sa production mondiale moyenne entre 2015 et 2017 est de 6 752 500 tonnes. Le Tableau 1 donne la production des principales régions, de même que les premiers pays dans le monde.

Tableau 1 : Production moyenne de la goyave à chair blanche entre 2015 et 2017 selon les régions et les pays

Pays ou continents producteurs	Volume (*1000Tonnes)
Asie	5519,3
Amérique du Sud	574,1
Afrique	435,6
Amérique Centrale et Caraïbes	223,5
Inde	3885,0
Pakistan	474,2
Chine	365,5
Brésil	353,2
Indonésie	264,8
Thaïlande	218,1
Malaysie	49,5

Source : Altendorf, 2018.

Sur le plan de la consommation, les Etats-Unis sont le premier pays importateur de goyaves provenant du Mexique, l'Inde, le Brésil, l'Equateur, la Colombie, les Républiques Dominicaines, les Philippines, l'Afrique du Sud, la Thaïlande et Taiwan (Jules et Robert, 2008 ; Hassan, Khurshid et Iqbal, 2012 ; Hernandez *et al.*, 2012 ; Altendorf, 2018).

La goyave à chair blanche fait partie des fruits les plus populaires et les plus consommés à cause de son coût relativement faible comparé à celui de plusieurs autres fruits, sa valeur nutritive, son goût, ses vertus thérapeutiques dues aux composés phénoliques qu'elle renferme et leur capacité antioxydante, les teneurs élevées en vitamines C et A ; ce qui lui confère l'appellation de "Pomme des tropiques" (Nag *et al.*, 2011).

1.1.2 Description botanique

Le goyavier (*Psidium guajava*) est un arbuste de la famille des *Myrtaceae*. Le goyavier est un arbuste dicotylédone, ou un arbuste à feuillage peu persistant, généralement haut de 3 à 10 m et possédant plusieurs branches ayant des branchettes incurvées. Les branchettes possèdent des feuilles opposées. Ces feuilles sont dépourvues de stipules et possèdent de courts pétioles longs de 3 à 10 mm. Il possède une écorce d'aspect variant du clair au brun rougeâtre. Les fleurs sont blanches, et 2 ou 3 fleurs peuvent être présentes au niveau de l'aisselle de la feuille. Ces fleurs possèdent 4 à 6 pétales incurvées et une anthère jaune (Orwa *et al.*, 2009).

En fonction de la forme de la goyave, les cultivars peuvent être classés en deux grands groupes : les pyrifera (goyave à chair blanche à la forme de la poire) ou goyave à chair blanche pear et les pomifera (forme ronde) ou goyave pomme. La couleur de la chair peut être rose, saumon, blanche ou jaune ; cependant les cultivars sont le plus souvent classés en goyaves à chair rose et goyaves à chair blanche. Sur les goyaviers naturels, le diamètre des fruits varie entre 3 et 7

cm ; tandis que sur des goyaviers de culture, ces diamètres peuvent atteindre 13 cm. La masse des fruits peut atteindre 700g. La goyave renferme de petits pépins durs dont le nombre varie entre 153 et 664 par fruit. Des variétés dépourvues de pépins ont également été développées. La couleur de la peau du fruit mûr est jaune, et sa texture peut être lisse ou rugueuse (Paull et Bittenbender, 2008 ; Sidhu, 2012).

La Figure 1 présente une image du goyavier de la goyave verte.



(A)

(B)

Figure 1 : (A) Photo du goyavier en floraison, (B) Photo des fruits verts sur le goyavier

1.1.3 Ecologie et culture

Le goyavier se développe sous un climat tropical et subtropical. Il s'adapte facilement aux climats chauds, mais se développe aussi dans les climats secs ou humides. Il se développe dans une aire ouverte comme la savane. Le goyavier est un arbuste résistant qui s'adapte aux conditions diverses de croissance. Il peut résister à des températures élevées, mais les meilleurs rendements

sont obtenus à des températures comprises entre 23 et 28°C. Les températures inférieures à 23°C ou supérieures à 27°C pendant la floraison diminuent considérablement la production des fruits. Dans les régions tropicales, les goyaviers quiescents résistent à la faible gelée et, à des températures supérieures à 16°C, 3,5 à 6 mois suffisent pour obtenir la floraison et la production des fruits. Le goyavier peut survivre à une altitude de 2000 m. Une pluviométrie optimale de 1000 – 2000 mm/an est optimale, bien qu'il se développe également sur des sols arides où la pluviométrie est sensiblement égale à 25 cm. Pour une production maximale, il exige une pluviométrie s'étendant sur toute l'année. Il se développe mieux sur des sols acides (pH 4,5) ; mais il peut aussi se développer sur des sols alcalins (pH 8,5). Il se développe également sur des sols pauvres avec un bon drainage. La production et la croissance sont meilleures sur des terres argileuses ; mais il peut aussi se développer sur des sols sableux. Il peut résister à des vitesses de vent de l'ordre de 16 – 32 km/h (Paull et Bittenbender, 2008 ; Orwa *et al.*, 2009 ; Hassan *et al.*, 2012).

Le goyavier commence à produire du fruit 1 à 2 ans après le plantage. La période de floraison a lieu pendant les mois de juin et juillet (saison des pluies) et la période de récolte s'étend de l'automne à l'hiver. La floraison sous un système artificiel d'irrigation a lieu entre février et mai avec une période de récolte s'étendant du printemps à l'été. Les goyaviers qui sont issus des techniques telles que le greffage ou le bourgeonnement peuvent porter les fruits 1 an après le plantage, alors que les goyaviers issus des semis peuvent porter les fruits 2 ans après le plantage. Les goyaviers issus des semis peuvent produire des fruits pendant 15 à 30 ans (Orwa *et al.*, 2009).

1.1.4 Composition chimique et valeur nutritionnelle

La goyave est constituée de 20% de peau, 50% de chair et 30% de pépins. C'est un fruit à faible valeur calorifique (275kJ/100g) et à faible teneur en protéine (environ 1%). Pendant le mûrissement, les solides solubles totaux et les sucres solubles augmentent de 10,5% à 12,75% et de 4,81% à 7,32% respectivement. La teneur en acide ascorbique augmente de 118,53 à 199,26 mg/100g, alors que l'acidité du fruit diminue de 0,72% à 0,55%. L'acidité provient des acides citrique, malique, glycolique, tartrique et lactique. Les teneurs en glucose, fructose et saccharose varient d'un cultivar à l'autre avec les cultivars rencontrés en Chine connus pour être ceux aux teneurs les plus élevées (Sidhu, 2012).

La goyave est également une bonne source de Phosphore, calcium, et fer, ainsi que de nombreuses vitamines (Vitamine C, niacine, acide pantothénique, thiamine, riboflavine et vitamine A). La teneur en composés phénoliques décroît au cours du ramollissement. Elle contient des composés comme la guaijavarine, la quercitine. Elle est très riche en composés aromatiques tels que : l'acide acétique, le 3-hydroxy-2-butanone, le 3-méthyl-1-butanol, le 3-méthylbutanoïque, le (Z)-3-hexène-1-ol, le 6-méthyl-5-heptène-2-one, le limonène, l'octanol, l'éthyl octanoate, le 3-phénylpropanol, l'alcool cinnamyl, l' α -copaène. Elle est également riche en pectine (0,1-1,8%) (Orwa *et al.*, 2009 ; Sidhu, 2012 ; Ali *et al.*, 2014).

Le Tableau 2 suivant présente la composition et la valeur nutritionnelle de la goyave.

Tableau 2: Composition et valeur nutritionnelle de la goyave

Composants	Teneurs (/100g de purée)
Teneur en eau (g)	82
Protéines (g)	1,1
Lipides (g)	0,4
Glucides (g)	15,7
Fibres (g)	5,3
Cendres (g)	0,73
Vitamine C (mg)	260
Fer (mg)	0,31
Calcium (mg)	20
Phosphore (mg)	25
Magnésium (mg)	10
Potassium (mg)	284
Sodium (mg)	3
Cuivre (mg)	0,103
Sélénium (µg)	0,6
Vitamine E (mg)	0,73
Vitamine A (µg)	31
Thiamine (mg)	0,05
Riboflavine (mg)	0,05
Niacine (mg)	1,20
Pyridoxine (mg)	0,143
Folate (µg/100g de purée)	14

Source : USDA, 2004 ; Ashaye *et al.*, 2005.

La goyave est quatre (4) fois plus riche en vitamine C que l'orange et elle est une bonne source de fibres alimentaires (Surajbhan *et al.*, 2012).

1.1.5 Utilisations

La goyave à chair blanche est un fruit climactérique extrêmement périssable qui a une durée de vie d'environ 3 à 4 jours lorsqu'elle est maintenue à la température ambiante. La goyave à chair blanche est consommée soit fraîche, soit transformée en d'autres produits. A cause de son faible coût, elle a une grande importance économique. La goyave à chair blanche peut être transformée en produits dérivés liquides ou semi-solides. La purée non pasteurisée et le jus de goyave à chair blanche peuvent être obtenus en suivant le schéma simplifié du procédé décrit à la Figure 2.

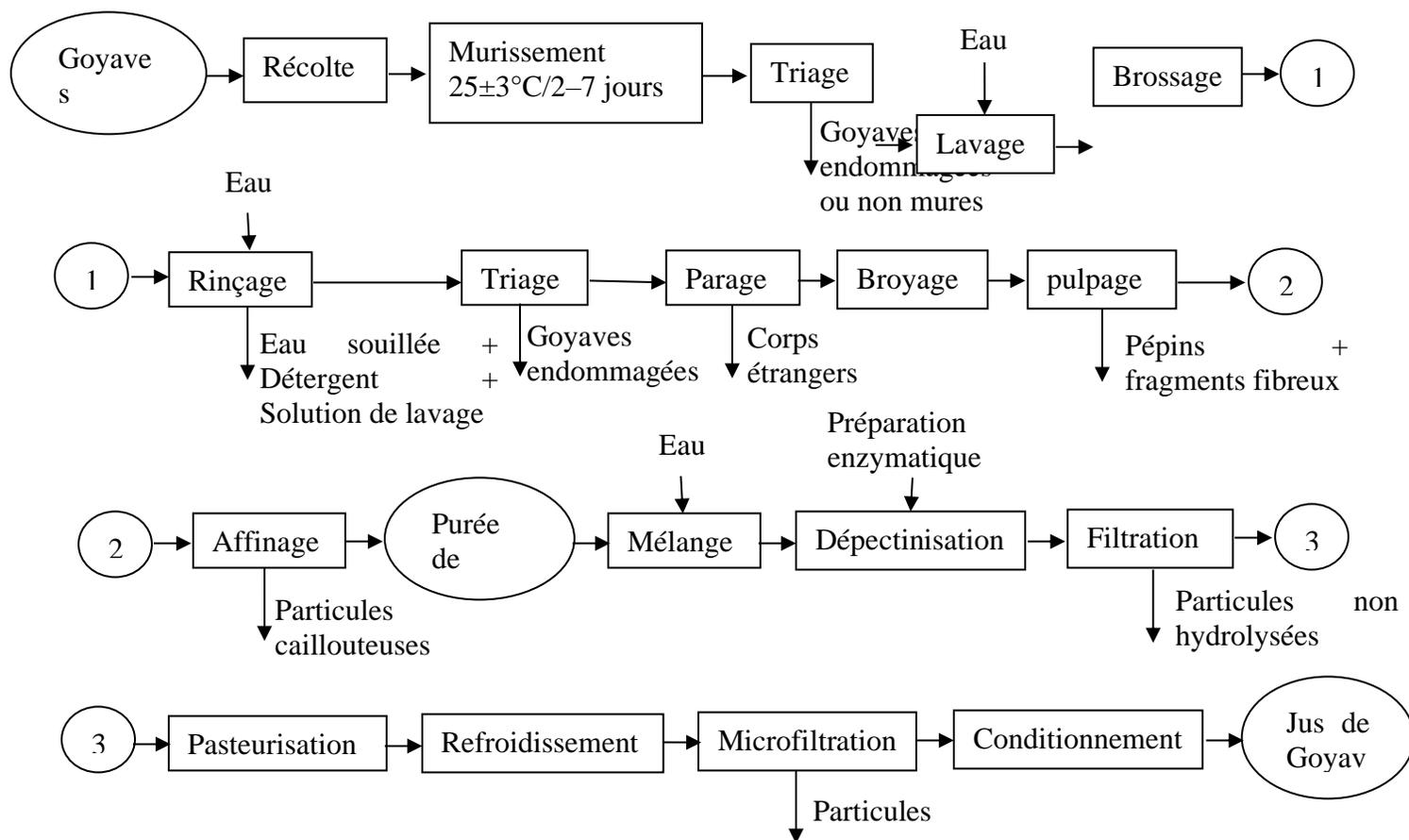


Figure 2 : Schéma simplifié du procédé de fabrication de la purée et du jus de goyave à chair blanche (Wu *et al.*, 2005)

Le concentré de goyave à chair blanche peut être fabriqué à partir de la purée ou du jus de goyave à chair blanche clarifié. Des concentrés de teneur en sucres solubles totaux d'environ 66° Brix peuvent être obtenus pour augmenter la durée de conservation ou pour le transport par bateau. Le nectar de goyave à chair blanche peut être fabriqué à partir de la purée, du jus de goyave à chair blanche clarifié et le concentré en les mélangeant avec de l'eau, du saccharose, de l'acide citrique et autres additifs pour obtenir un nectar trouble ou un nectar clair. D'autres produits dérivés liquides pouvant être fabriqués à partir du jus de goyave à chair blanche clarifié de goyave à chair blanche sont la gelée, les mélanges de jus ou de nectar de fruits, les boissons gazéifiées de goyave, le vin de goyave à chair blanche (Wu *et al.*, 2005).

Les produits dérivés semi-solides à base de goyave à chair blanche comprennent la barre de goyave, les confitures, les gelées, les bonbons, les conserves de fruits, les cannettes de goyave à chair blanche et le « beurre de goyave à chair blanche ». La goyave à chair blanche peut également être utilisée pour enrichir les produits laitiers. Les autres parties (troncs, feuilles) peuvent être utilisées pour produire du charbon, produire de l'alcool, extraire les huiles essentielles, faire la pratique de l'aquaculture (Wu *et al.*, 2005 ; Orwa *et al.*, 2009 ; Nag *et al.*, 2011 ; Teixeira *et al.*, 2011).

La goyave à chair blanche a de nombreuses vertus thérapeutiques. Elle possède des propriétés antioxydantes. Le fruit est riche en vitamine C. La consommation du fruit peut avoir à long terme des effets cardioprotectifs résultant de l'effet antioxydant. Le fruit est aussi une source de fibres alimentaires. La goyave à chair blanche est laxative. Elle permet ainsi une amélioration de l'état de santé (Yamashiro *et al.*, 2003; Jimenez-Escrig *et al.*, 2001).

1.2 LES PECTINES

1.2.1 Structure de la pectine

Les membranes cellulaires des végétaux sont les éléments majeurs qui contribuent à la forme et aux propriétés des structures végétales. Les polysaccharides de la membrane cellulaire des végétaux tels que les pectines, les celluloses, les hémicelluloses, les polysaccharides de réserve tels que l'amidon et le galactomannane, les gommés et les mucilages, constituent un mélange très diversifié de biopolymères, lesquels jouent un rôle important en tant qu'éléments de structure. La pulpe des fruits ou leur mésocarpe est la partie comestible du fruit et est composée de cellules de stockage. Ces cellules sont caractérisées par une membrane constituée d'un réseau complexe de polysaccharides et de protéines, laquelle confère aux tissus une force mécanique. La paroi cellulaire primaire contient en base sèche 35% de pectines, 25% de cellulose, 20% d'hémicellulose et 10% de protéines de structure riches en hydroxyproline (Prasanna *et al.*, 2007 ; Howell et Davis, 2005 ; Willats *et al.*, 2001).

Les pectines sont des macromolécules glucidiques complexes à haut poids moléculaire, négativement chargées et acides, existant dans le règne végétal. Contrairement aux protéines, aux lipides et acides nucléiques, elles n'ont pas un poids moléculaire défini et celui-ci varie d'un fruit ou légume à l'autre (Jayani *et al.*, 2005). Elles sont très abondantes dans la lamelle moyenne où elles assurent une adhésion intracellulaire, contribuant ainsi à la fermeté et à la structure des tissus végétaux. Elles sont présentes en quantité réduite ou sont absentes dans les membranes cellulaires secondaires (Willats *et al.*, 2001 ; Gummadi et Panda, 2003). Les molécules de pectine étant négativement chargées, elles peuvent être complexées par des cations divalents tels que les ions calcium et magnésium présents dans les interstices. L'association avec lesdits cations confère la

fermeté. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion et le maintien des cellules des tissus végétaux, servant de ciment qui rattache ces cellules les unes aux autres (Prasanna *et al.*, 2007 ; Jayani *et al.*, 2005 ; Combo *et al.*, 2011).

Sur le plan structurel, les pectines sont généralement considérées comme une alternance des zones dites lisses et des zones dites hérissées. Les premières zones sont aussi connues sous le nom d'homogalacturonane, tandis que les deuxièmes zones sont connues sous le nom de rhamnogalacturonane I (Koubala *et al.*, 2008, Nikolić et Mojovic, 2007). Plusieurs groupements ou chaînes polysaccharidiques peuvent être rattachées à l'homogalacturonane : les xylogalacturonanes, les apiogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes, les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes. Cette association permet de décrire les pectines comme étant constituées essentiellement de trois domaines distincts dans les parois cellulaires végétales : le rhamnogalacturonane II (RG-II), le rhamnogalacturonane I (RG-I) et l'homogalacturonane (Combo *et al.*, 2011 ; Howell et Davis, 2005).

L'homogalacturonane (HG) est un polymère linéaire constitué uniquement d'acides D-galacturoniques 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. Il a une longueur d'environ 100 nm. L'homogalacturonane représente environ 60% des pectines de la paroi cellulaire (Combo *et al.*, 2011 ; Prasanna *et al.*, 2007 ; Brudieux, 2007). Le squelette d'homogalacturonane serait constitué de 100 résidus de l'acide galacturonique (Salas-Tovar *et al.*, 2017). Les acides galacturoniques de l'homogalacturonane peuvent être substitués en O3 par les résidus de xylose pour obtenir un domaine connu sous le nom de xylogalacturonane (XGA) qui est très répandu. Dans ce domaine, les résidus supplémentaires de xylose peuvent être liés au premier xylose par des liaisons β - (1 –

4) (Willats *et al.*, 2001 ; Harholt *et al.*, 2010). Les acides galacturoniques peuvent également être substitués en O2 ou O3 par des chaînes latérales de β -D-Apiofuranose (Apif) et de β -D-Apif-(1,3')- β -D-Apif pour obtenir le domaine connu sous le nom d'apiogalacturonane dont la fonction biologique n'est pas connue (Brudieux, 2007).

En fonction du taux de méthylestérification, l'homogalacturonane peut être désigné par pectine (taux de méthylestérification élevé) ou acide pectique (taux de méthylestérification faible). Les pectines dont les unités linéaires d'homogalacturonane ont plus de 50% de l'acide galacturonique méthyl-estérifiés au niveau du carbone C6 sont appelées « pectines HM (Hautement méthylées) » ; tandis que celles dont les unités possèdent un pourcentage plus faible sont appelées « pectines LM (faiblement méthylées) » (Salas-Tovar *et al.*, 2017). Le taux de méthylestérification des régions homogalacturonanes détermine leur capacité d'interaction. L'élimination des groupements méthoxyl confère à l'homogalacturonane la capacité de former des liaisons avec les ions calcium, ce qui conduit à la formation des gels (Brudieux, 2007 ; Ralet *et al.*, 2005 ; Willats *et al.*, 2001).

Le Rhamnogalacturonane I est une famille de polysaccharides pectiques qui représente 7 à 14% des pectines. C'est un polymère ramifié dont le squelette n'est pas un polymère de l'acide galacturonique, mais une répétition d'unités disaccharidiques de [α - (1 - 4) - D - acide galacturonique - (1 - 2) - α - L - rhamnose]. Le nombre d'unités disaccharidiques peut être supérieur à 100. Les résidus de rhamnose peuvent être ramifiés en leur O-4 par les sucres neutres et la proportion des résidus pouvant être ramifiés peut varier d'environ 20% à environ 80% en fonction de la source de polysaccharide. Ces chaînes ramifiées sont principalement composées de résidus de galactosyl et/ou d'arabinosyl. Elles comprennent une unité simple de [β - D - Galp - (1 - 4)], mais aussi des unités polymériques telles que l'arabinogalactane I (AG-I) et d'arabinane

(50 résidus de glycosyl ou plus). L'AG-I est composé d'un squelette d'unités de 1,4 - β - D - Galp ; les résidus d' α - L - Araf peuvent être attachés au O-3 des résidus galactosyl. Les arabinanes comprennent un squelette d'unités de 1,5 - α - L - Araf qui peuvent être branchées par des chaînes d' α - L - Araf - (1 - 2), α - L - Araf - (1 - 3) et/ou α - L - Araf - (1 - 3) - α - L - Araf - (1 - 3) -. Cette structure complexe du RGI lui confère l'appellation de « région hérissée » dans laquelle l'AG-I et l'arabinane sont les « poils » (Vincken *et al.*, 2003 ; Willats *et al.*, 2001 ; Brudieux, 2007 ; Harholt *et al.*, 2010). Le RGI jouerait un rôle de plastifiant dans la membrane cellulaire. Les arabinanes qu'il renferme joueraient un rôle de régulateur de proximité entre les domaines d'HG ; ils empêcheraient la formation de liaison avec Ca²⁺ entre les régions d'HG. L'arabinane et le galactane sont des polymères fortement mobiles comparés aux autres constituants de la pectine, et cette mobilité est influencée par l'hydratation de la membrane cellulaire. Selon les conditions de cette hydratation, ces deux polymères seront les premiers à diffuser (cas de la réhydratation) ou les derniers (cas de la dessiccation) remplissant de ce fait les cavités créées par le réarrangement physique de la membrane cellulaire. Les constituants du RGI joueraient un rôle direct dans le comportement rhéologique de la membrane en transmettant les contraintes (Harholt *et al.*, 2010).

Le rhamnogalacturonane II (RG II) est un composant mineur de la paroi cellulaire. Il représente 10 à 11% de la pectine. La chaîne principale du RG-II est un homogalacturonane constituée par au moins 9 résidus de l'acide galacturonique liés en α - (1,4) et qui peuvent être ramifiés en O-2 ou en O-3. Quatre différentes chaînes (de longueur connue et consistante) avec des résidus distincts de sucre sont présentes dans la structure du RGII. Ces chaînes sont constituées de onze sucres différents parmi lesquels l'apiose, l'acide acérique, le Dha (l'acide 3 - deoxy - D - lyxo - heptulosarique) et le Kdo (l'acide 2 - keto - 3 désoxy - D - manno - octulosonique). Une caractéristique importante du RGII est que deux molécules peuvent être complexées avec le bore

et former un ester borate – diol ; ce qui peut relier deux molécules d’HG. Seuls les résidus d’apiofuranosyl des chaînes contenant le 2 – O – méthyl – D – xylose dans chaque sous-unité du dimère participent à la liaison. Le RG-II est le seul domaine pectique majeur qui ne présente pas une diversité notable dans sa structure et celle-ci est très conservée au sein d’espèces végétales. Bien que le RG-II soit présent en petite proportion, il joue un rôle très important dans l’architecture de la paroi cellulaire (Willats *et al.*, 2001 ; Vincken *et al.*, 2003 ; Harholt *et al.*, 2010).

La Figure 3 représente la structure primaire de la pectine avec la mise en évidence de ses différentes régions et domaines.

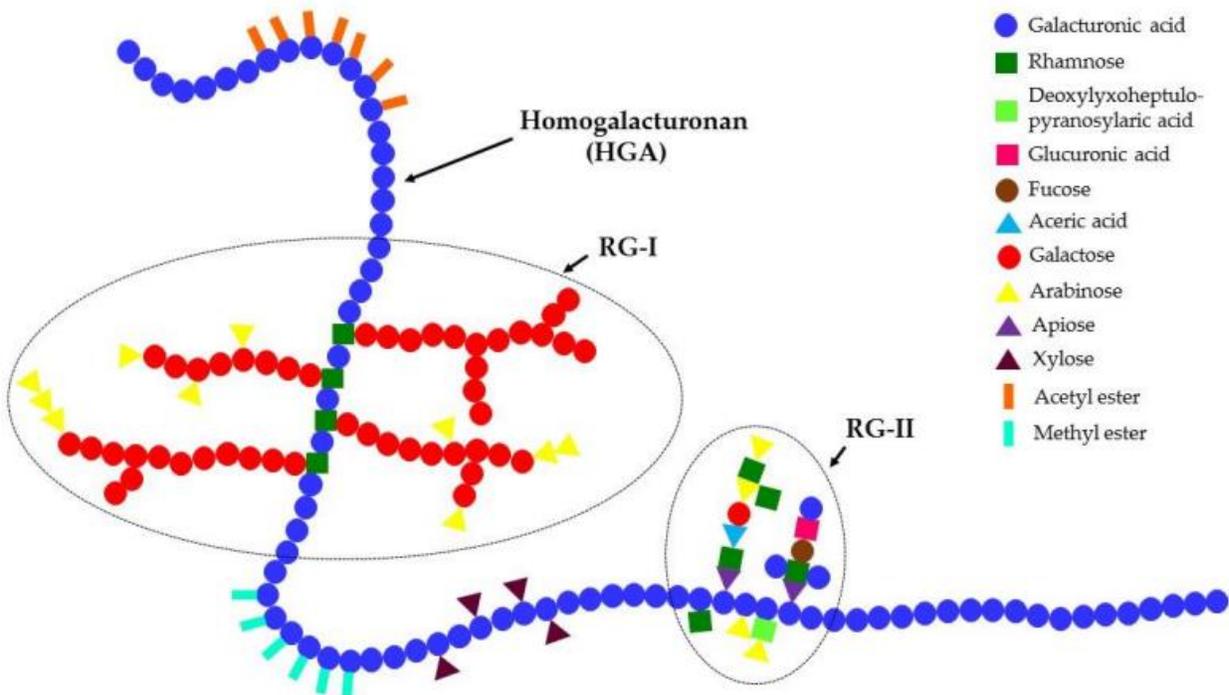


Figure 3: Représentation schématique de la structure primaire de la pectine. HGA, RG-I et RG-II représentent l’homogalacturonane, le Rhamnogalacturonane I, et le Rhamnogalacturonane, respectivement (Source : Minzanova *et al.*, 2018).

La Figure 4 représente la structure de l’acide galacturonique et de l’homogalacturonane avec la mise en évidence de certains résidus méthoxylés de l’acide galacturonique.

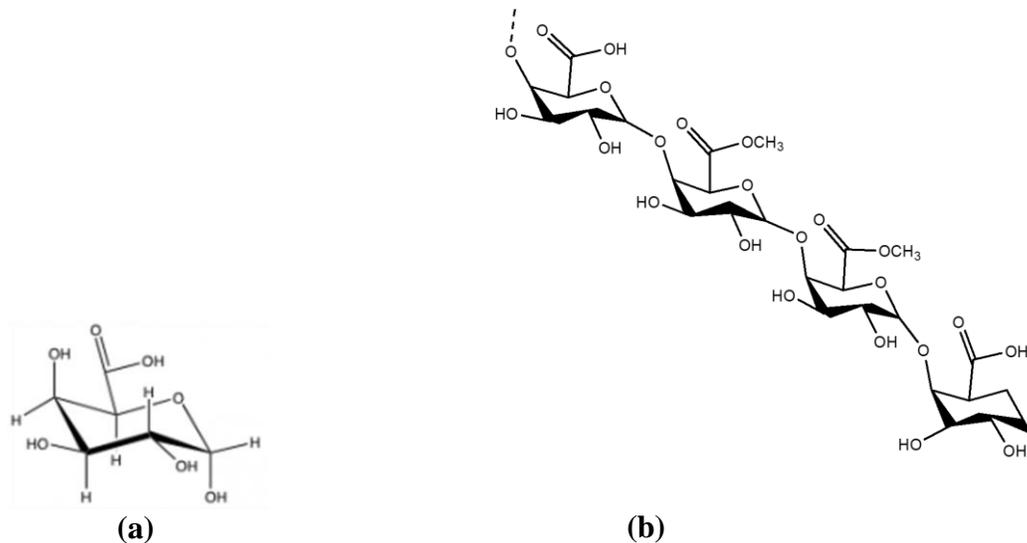


Figure 4: Représentation schématique de la structure de l'acide galacturonique (a) et de l'homogalacturonane (b) (Source : Sriamornsak, 2003)

1.2.2 Les modifications des pectines pendant le mûrissement de fruits et légumes

Pendant le mûrissement, des modifications diverses de la structure de la membrane cellulaire se produisent ; celles-ci sont couplées à la dissociation de la lamelle moyenne et la rupture de la membrane cellulaire primaire. Ces modifications comprennent la solubilisation et la dépolymérisation des polysaccharides (pectine, cellulose et hemicellulose) et les réarrangements de leurs associations. Les modifications des pectines résulteraient de deux processus : la solubilisation et la dépolymérisation. La solubilisation des pectines est le résultat de la conversion (hydrolyse) de la protopectine, polymère insoluble à haut poids moléculaire, en pectine soluble dont la liaison à la membrane cellulaire est plus faible que celle de la protopectine. Cette hydrolyse est effectuée par des protopectinases endogènes produites lors de la phase de maturation du fruit.

A la solubilisation de la pectine est couplée la perte de sucres neutres des chaînes ramifiées de la pectine. La perte de galactose des chaînes de rhamnogalacturonane semble être l'événement le plus notable. La perte d'arabinose et de xylose pourrait également être observée chez certains fruits. La solubilisation de la pectine résulterait de la perte de la matrice pectique cohésive, de la dissociation des molécules de pectine les unes des autres du fait de la perte de résidus galactosyls ou d'autres sucres neutres des chaînes de rhamnogalacturonane. Ces modifications ont pour conséquences le ramollissement des membranes cellulaires, leur hydratation due à la modification de lamelle moyenne riche en pectine et la perte de la cohésion cellulaire (Goulao et Oliveira, 2008). Les pectines sont les seuls polysaccharides de la membrane cellulaire capables de se solubiliser dans l'eau, elles peuvent être déstérifiées et dépolymérisées par voie enzymatique. La dépolymérisation et la déstérification sont des processus biochimiques résultant de l'action des pectinases endogènes. Celles-ci, d'une manière concertée, vont hydrolyser la pectine en de composés de faible poids moléculaire. L'hydrolyse ainsi que la dépolymérisation et la déstérification des pectines sont les phénomènes les plus apparents ayant lieu pendant le mûrissement des plusieurs fruits (Prasanna *et al.*, 2007).

1.2.3 Propriétés et Utilisations des pectines

Les solutions diluées de pectine ont un comportement newtonien ; mais à des concentrations élevées, elles présentent un comportement non-newtonien et pseudoplastique. La viscosité, la solubilité et la gélification sont des propriétés généralement liées. Les facteurs qui augmentent la force du gel, diminueront la solubilité, et augmenteront la viscosité (Sundar Raj *et al.*, 2012). Les caractéristiques chimiques des pectines qui influencent la force du gel sont le degré de méthylation et le poids moléculaire. Les solutions de pectine HM se gélifient rapidement, alors que celles LM se gélifient par une structure dite "Egg-Box" (alvéole d'œuf) dans laquelle les

ions calcium forment des liaisons ioniques avec les fonctions oxygène de deux chaînes adjacentes pour les lier. La force de la pectine augmente avec son poids moléculaire (Pagán *et al.*, 2001). Les pectines ont la possibilité de former des gels avec des sucres et des acides. Cette propriété confère aux pectines la capacité d'être utilisées comme additifs alimentaires pour épaissir, gélifier et émulsifier les confitures, les gelées, les marmelades, les boissons sucrées, les produits avicoles et carnés (Koubala *et al.*, 2008). Elles sont utilisées dans les confiseries comme agent stabilisant pour les produits laitiers acides. Elles ont connu plusieurs applications récentes dans les industries pharmaceutiques à cause de leurs activités antidiarrhéiques, antibactériennes, antivirales, cicatrisantes, désintoxicantes, de régulation et protection du tractus gastro-intestinal. Elles sont également utiles dans la réduction du temps de coagulation du sang et jouent de ce fait un rôle dans le contrôle de l'hémorragie et des saignements locaux. Elles sont également utilisées parce qu'elles retardent la boulimie, diminuent le taux de cholestérol sanguin et le métabolisme du glucose (Prasanna *et al.*, 2007 ; Sundar Raj *et al.*, 2012). Elles connaissent des applications dans le domaine de la dentisterie, de la cosmétique et de la fabrication de la cigarette (Pagán et Ibarz, 1999).

1.3 LES PECTINASES

Les pectinases sont des enzymes responsables de l'hydrolyse de la pectine. Etant donnée la complexité de la structure de la pectine, les pectinases peuvent être classées selon trois critères principaux : le type de substrat, le mécanisme d'action et le type de réaction catalysée. Selon le type de substrat, une distinction est faite entre la pectine, l'acide pectique et l'oligo – D – galacturonate. Selon le mécanisme d'action, le saucissonnage peut se faire de manière aléatoire (endo-) ou à partir de l'extrémité (exo-). La réaction catalysée peut être une trans-élimination ou une hydrolyse (Tapre et Jain, 2014). Les pectinases peuvent être classées en trois grands groupes :

les enzymes de désestérification, les enzymes de dépolymérisation, et les protopectinases. Le premier groupe est essentiellement constitué de polyméthylgalacturonate estérase (PMGE) connue sous le nom de « Pectine Estérase » (PE). Le deuxième groupe est subdivisé en hydrolases et en lyases. Les hydrolases comprennent les polygalacturonases qui peuvent être de type endo ou exo (exo – PG1 ou exo – PG2) et les polyméthylgalacturonases (PMG) qui peuvent également être de type endo et exo. Les hydrolases catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidique par introduction d'une molécule d'eau au niveau du pont d'oxygène. Les lyases débranchent les chaînes de pectines par transélimination (sans addition de molécule d'eau) des liaisons glycosidiques α (1,4) avec formation d'une liaison insaturée entre les carbones C4 et C5 de l'extrémité non réductrice de l'acide galacturonique formé. Elles comprennent les polygalacturonate lysases (PGL) de type endo ou exo, les oligogalacturonate lyases, et les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL) sont également de type endo ou exo. La protopectinase, quant à elle, solubilise la protopectine formant les polymères solubles de pectine (Jayani *et al.*, 2005).

D'autres pectinases existent ; celles-ci n'ont pas encore fait l'objet de nombreuses études, raison pour laquelle peu d'informations concernant leur structure sont disponibles. Ces enzymes comprennent celles qui agissent sur les chaînes latérales des pectines (RGI et RGII). Elles sont constituées entre autres : des rhamnogalacturonases, des rhamnogalacturonane acétyl esterases, de la rhamnogalacturonane lyase, de la xylogalacturonane hydrolase, des arabinofuranosidases, des endoarabinanases, des galactosidases, des galactanases et du feruloyl esterase (Benen *et al.*, 2003). Toutes ces enzymes pectinolytiques jouent un rôle important dans le processus de ramollissement des tissus de la paroi cellulaire ; leur activité spécifique contribue à l'altération de la structure des pectines pendant le mûrissement, la sénescence ou la transformation de plusieurs fruits et légumes

contribuant à la diminution de l'adhésivité intracellulaire et la rigidité des tissus (Van Dijk *et al.*, 2006 ; Prasanna *et al.*, 2007).

Une attention particulière sera accordée aux enzymes les plus étudiées et les plus présentes dans les préparations industrielles. Il s'agit de la Pectine Estérase (PE) et la Polygalacturonase (PG).

1.3.1 La pectine estérase (PE) ou Pectine méthyl estérase (PME)

La Pectine Méthyl Estérase (PME) (EC 3.1.1.11) encore appelée Pectine Estérase, Pectase, Pectine Méthoxylase, Pectolipase est une enzyme pouvant être isolée à partir des végétaux, des bactéries et des moisissures. Les PME ont, en fonction de leur source, des points isoélectriques, des masses moléculaires et des propriétés biochimiques différents. Il s'agit d'une estérase d'acide carboxylique appartenant au groupe des hydrolases (da Silva Cerqueira Leite *et al.*, 2006 ; Ümit Ünal et Bellur, 2009).

1.3.1.1 Mode d'action

La PME hydrolyse les liaisons méthyl ester de l'homogalacturonane pour libérer des groupements carboxyliques libres et le méthanol. A l'issue de cette désestérification, les résidus de l'acide galacturonique déméthoxylés et négativement chargés deviennent potentiellement capables d'interaction ionique avec des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ...). Il se produit une association de molécules formant ainsi un gel de pectate. La coordination d'au moins 10 résidus de l'acide galacturonique déméthoxylés génère une structure alvéolaire (« egg box structure ») (Salas-Tovar *et al.*, 2017). Le mode d'action de la PME est représenté sur la Figure 5 suivante :

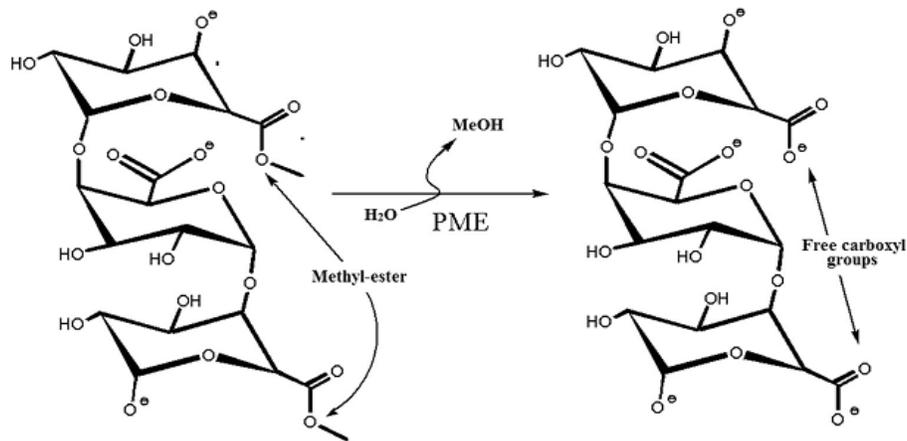


Figure 5: Mode d'action de la PME (Salas-Tovar *et al.*, 2017)

Les PME hydrolysent seulement les groupements esters adjacents à un groupement carboxyle libre et libèrent ainsi les groupements méthoxyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée. Le mécanisme d'attaque des PME varie en fonction de l'origine. Ainsi, les PME d'origine fongique agissent de manière aléatoire suivant un mécanisme d'attaque dit « chaîne multiple » selon lequel l'enzyme forme avec le substrat un complexe enzyme-substrat, se dissocie après l'événement catalytique et s'associe de nouveau avec la molécule de substrat pour libérer les groupements méthoxyles. En revanche, les PME d'origine végétale tendent à réagir à partir de l'extrémité non réductrice ou à côté d'un groupement carboxyle libre et évolue le long de la molécule par un mécanisme d'attaque à « chaîne unique » où le substrat est progressivement déméthoxylé jusqu'à ce que l'enzyme atteigne l'extrémité de la chaîne ou un groupement qui restreint sa progression le long de la chaîne. Un troisième mode, intermédiaire aux deux précédents, a également été constaté ; il s'agit également d'un mécanisme d'attaque à chaîne multiple. Dans ce cas, lorsque le complexe enzyme substrat est formé, l'enzyme catalyse la transformation d'un certain nombre de monomères d'une branche de pectine (Denès *et al.*, 2000 ; Jayani *et al.*, 2005 ; Cameron *et al.*, 2008 ; Salas-Tovar *et al.*, 2017).

1.3.1.2 Facteurs influençant l'activité de la PME

D'une manière générale, les facteurs du milieu influençant l'activité de la PME sont : la concentration en substrat, le pH, la température, la force ionique. Plusieurs travaux de recherche ont été effectués sur l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur l'activité de la PME.

✓ Le substrat : l'activité maximale de la PME est atteinte pour un degré de méthylation compris entre 65% et 75%. La PME est inhibée par l'augmentation du nombre des groupements carboxyliques libres le long des chaînes polygalacturoniques. Cette inhibition est due à la répulsion intra et intermoléculaire exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. Cette inhibition des PME serait également due aux chaînes latérales de sucres neutres dans la molécule de pectine (Jayani *et al.*, 2005 ; Combo *et al.*, 2011).

✓ Le pH : l'activité de la PME dépend du pH. En général, les PME d'origine bactérienne et végétale ont un pH optimum compris entre 6 et 8, alors que celles d'origine fongique ont un pH optimum compris entre 4 et 6 (Jayani *et al.*, 2005 ; Ümit, Ünal et Bellur, 2009).

✓ La température : l'activité de chaque enzyme varie avec la température. La température optimale de la PME dépend de sa source. Les PME d'origine végétale ont des températures optimales d'activité variant de 50 à 80°C, tandis que celles d'origine microbienne sont plus actives à des températures comprises entre 40 et 50°C (Do Amaral, De Assis et De Faria Oliveira, 2005 ; Jayani *et al.*, 2005 ; Da Silva Cerqueira Leite *et al.*, 2006 ; Ümit, Ünal et Bellur, 2009)

✓ La force ionique : les ions issus des sels à différentes molarités peuvent avoir un effet d'activation ou d'inhibition sur l'activité de la PME. D'après les travaux de Do Amaral, De Assis et De Faria Oliveira (2005), la présence de 0,15 M de NaCl ou 0,025 M de Na₂SO₄, 0,1 M de KCl, 0,025 M de K₂SO₄, 0,05 et 0,1 M de NH₄Cl entraînait une augmentation de l'activité de la PME des oranges. Ces mêmes travaux ont révélé que quelle que soit la concentration de chlorure de

lithium et de sulfate de lithium, la PME était inhibée. Les travaux réalisés par Da Silva Cerqueira Leite et al. (2006) ont révélé que les cations Na^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} augmentent l'activité de la PME de la goyave à chair blanche brésilienne.

Du point de vue technologique, la PME endogène peut avoir des effets bénéfiques ou indésirables sur la qualité des produits dérivés des végétaux. Comme effets bénéfiques, elle désestérifie la pectine préparant ainsi un substrat idéal pour l'action de la Polygalacturonase qui va réduire la viscosité et modifier la texture. En plus, la déméthoxylation de la pectine réduit sa susceptibilité à la dépolymérisation thermique par β -élimination qui peut avoir lieu lors du chauffage. Elle affecte les différentes propriétés et applications technologiques de la pectine (Section 1.2.3). Comme effets indésirables, la précipitation des pectines de faible degré de méthylation avec les ions divalents conduit à la formation de gel mais aussi à la diminution de la turbidité des jus de goyave à chair blanche et légumes. Cela conduit à la déstabilisation de la suspension et entraîne la précipitation des particules de jus. Cela constitue un problème de qualité organoleptique dont en particulier l'apparence, d'où l'intérêt d'inactiver la PE au cours de la production des jus de fruit (Jolie *et al.*, 2010 ; Ümit Ünal et Bellur, 2009 ; Salas-Tovar *et al.*, 2017).

1.3.2 Les polygalacturonases (PG)

Les polygalacturonases (PG) (EC 3.2.1.15) sont produites par les végétaux, les microorganismes tels que les bactéries et les moisissures, mais elles sont très peu produites par levures (Mohamed, 2006). Elles sont les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire les plus abondamment étudiées (Howell et Davis, 2005 ; Willats *et al.*, 2001). Elles constituent les glycanases primaires qui jouent un rôle très important dans la dissolution *in vivo* de la pectine.

Elles sont les principales responsables des modifications des caractéristiques texturales des fruits pendant le mûrissement conduisant à une diminution de la fermeté (Prasanna *et al.*, 2007).

1.3.2.1 Mode d'action

Les PG appartiennent à la famille 28 des glycosyls hydrolases et catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1,4) entre deux unités d'acides galacturoniques non ou partiellement méthoxylées en introduisant une molécule d'eau au niveau du pont oxygène (Benen *et al.*, 2003 ; Jayani *et al.*, 2005). Dans leur structure, huit (08) résidus d'acide aminés existent ; il s'agit de : Asn¹⁷⁸, Asp¹⁸⁰, Asp²⁰¹, Asp²⁰², His²²³, Gly²²⁴, Arg²⁵⁶ et Lys²⁵⁸. La glycosylation se fait de la manière suivante : l'un des résidus acides agit comme un acide, donnant un proton à l'oxygène glycosidique de la liaison ; et un second carboxylate agit comme une base qui active une molécule d'eau qui effectuera l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique du sucre. Dans le cas de l'endopolygalacturonase II, c'est l'acide aminé Asp²⁰¹ qui assure la première réaction ; tandis que les acides aminés Asp¹⁸⁰ et Asp²⁰² activeront la molécule d'eau qui leur est liée (Figure 6). Cette molécule d'eau effectuera l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique de l'acide galacturonique pour produire la scission de la liaison glycosidique (van Santen *et al.*, 1999).

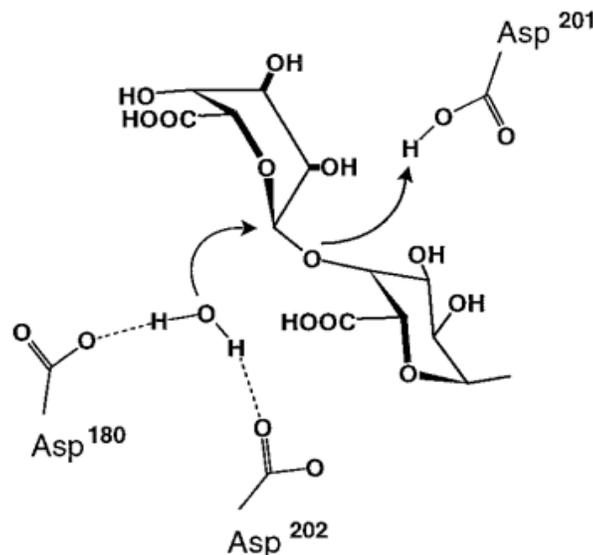


Figure 6: Représentation schématique du mécanisme catalytique des glycosyl hydrolases de la famille 28 (Source : van Hansen *et al.*, 1999).

En fonction de leur mode d'action (Figure 7), les polygalacturonases peuvent être classées en deux grands sous-groupes : les exo-polygalacturonases (exo-poly (1,4 α - D - galacturonide) galacturonohydrolase, EC 3.2.1.67) qui hydrolysent la pectine à partir de l'extrémité non-réductrice et les endo-Polygalacturonases (endo-poly (1,4 α - D - galacturonide) glycanohydrolase, EC 3.2.1.15) qui l'hydrolysent de manière aléatoire (Prasanna *et al.*, 2007). En général, par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'attaque « multi-chaînes », l'action des endo-PG libère des mono-, di- et triacides galacturoniques avec pour conséquence une diminution rapide de la viscosité (Combo *et al.*, 2011).

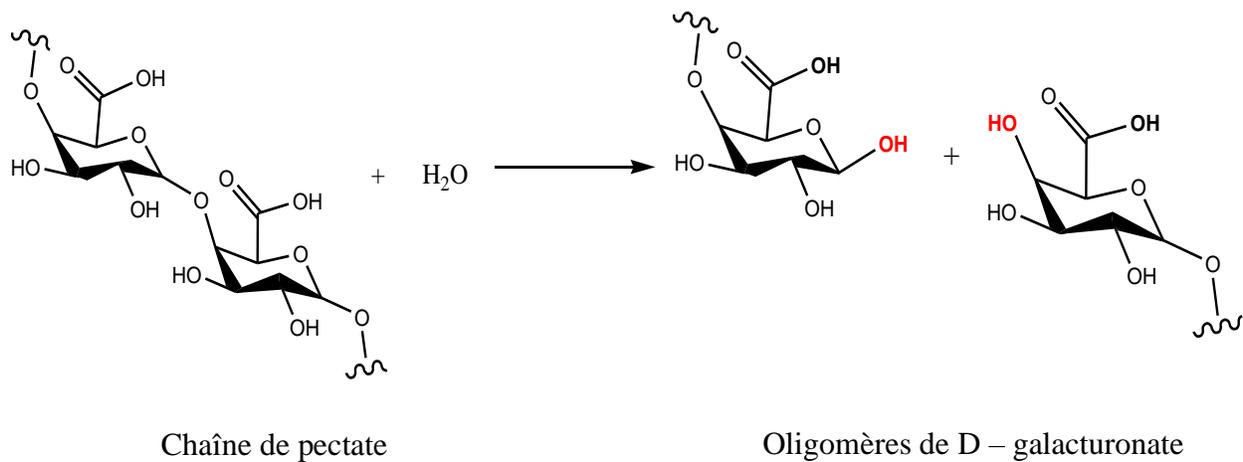


Figure 7: Hydrolyse de la chaîne de pectate par des polygalacturonases (PG). (Source : www.worthlinton-biochem.com)

Le mécanisme d'attaque des polygalacturonases peut se faire de différentes façons :

- ✓ Dans l'attaque sur des simples chaînes, une première liaison est hydrolysée au hasard au sein du polymère, puis l'enzyme l'hydrolyse totalement en glissant le long d'un des

fragments ainsi obtenus. Les oligomères de très faible degré de polymérisation (DP) issus des dégradations successives apparaissent dès le début de la réaction (Bekhouche, 2006).

- ✓ Dans l'attaque sur plusieurs chaînes, l'enzyme s'associe au hasard avec le substrat pour former un complexe enzyme-substrat (ES). Après la catalyse de la liaison glycosidique, l'enzyme se sépare du polymère et le complexe ES se forme ailleurs indépendamment du premier. Ce mécanisme libère des oligomères de degré de polymérisation (DP) élevé qui seront par la suite dégradés en oligomères de DP de plus en plus faible (Bekhouche, 2006).
- ✓ Dans l'attaque multiple, les deux précédents mécanismes se combinent pour dégrader les chaînes du polymère les unes après les autres. Le complexe enzyme substrat (ES) se forme au hasard, l'enzyme coupe la liaison et le complexe (ES) se forme ailleurs sur la même chaîne. Ce mécanisme permet la libération rapide d'oligomères de faible DP ; leurs modes d'action se caractérisent par une chute rapide de la viscosité du substrat en solution (Bekhouche, 2006).

Les exopolylgalacturonases (exo PG) hydrolysent les liaisons $\alpha - (1 - 4)$ entre deux résidus d'acide D-galacturonique ; elles agissent généralement à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne dont les AG ne sont pas estérifiés. Le principal produit formé est l'acide galacturonique. La vitesse de la réaction est dépendante du degré de polymérisation et augmente avec l'augmentation du poids moléculaire du substrat. Les exo PG sont de deux types selon le produit de la réaction. Le type I (PG, poly, α -1,4-D galacturonide galacturonohydrolases, E.C. 3.2.1.67) libère l'AG1 et le type II (PG, poly, α -1,4-D-galacturonide digalacturonohydrolases, E.C.3.2.1.82) libère l'AG2. L'activité de ces deux types d'enzymes peut être inhibée par la présence de résidus de rhamnose ou de chaînes latérales d'oses neutres et également la présence de méthyl (Me). En effet, lorsque le second résidu à partir de l'extrémité non réductrice est méthoxylé, l'exo-

polygalacturonase de type I est incapable de libérer l'AG non réducteur. Les exo-PG sont caractérisées par la libération de groupements réducteurs, mais une faible diminution de la vitesse (Bekhouche, 2006 ; Prasanna *et al.*, 2007).

1.3.2.2 Facteurs influençant l'activité des PG

L'activité des PG dépend également des facteurs du milieu réactionnel.

✓ Le pH : le pH optimal d'activité des PG d'origine microbienne ou végétale est situé entre 3,5 et 5,5 (Jayani *et al.*, 2005).

✓ La température : La plupart des PG ont une température optimale d'activité comprise entre 30-50°C (Jayani *et al.*, 2005).

✓ La force ionique : la présence des sels peut activer ou inhiber l'activité des PG. D'après les travaux de Mohamed *et al.* (2006), les ions métalliques Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} et Co^{2+} inhibent partiellement ou totalement l'activité des polygalacturonases des *Trichoderma harzianum*.

1.3.3 APPLICATIONS DES PECTINASES

1.3.3.1 Applications dans la transformation des jus de fruits et en vinification

Dans les procédés industriels destinés à la consommation, les pectinases les utilisées sont celles provenant des moisissures. Les plus rencontrées sont produites les moisissures du genre *Aspergillus* avec une prédominance de celles issues d'*A. niger* et *A. aculeatus*. Les raisons de cette préférence sont les propriétés technologiques appréciées des pectinases de ces moisissures, le caractère moins nocif sur la santé des consommateurs et l'effet négligeable sur l'environnement des sous-produits issus de leur action (Naidu et Panda, 1999). Les pectinases produites par ces

deux moisissures ont reçu la mention de " Generally Recognised As Safe " (GRAS) par l'USDA (Pariza et Foster, 1983 ; Naidu et Panda, 1999). Ces raisons justifient l'utilisation dans cette étude des pectinases de la moisissure d'*Aspergillus niger*.

L'application des pectinases dans la clarification des jus de goyave à chair blanche est la plus répandue de ces enzymes. La pectine rend les jus de goyave à chair blanche visqueux et troubles. Du fait de sa structure moléculaire fibreuse, elle affecte la filtration du jus de goyave à chair blanche en colmatant les membranes de clarification avec pour conséquence la diminution du flux de filtrat. L'utilisation des pectinases dans les jus de goyave à chair blanche et les vins conduit à la liquéfaction de la purée facilitant l'opération de filtration ou de pressage. Il en résulte une augmentation du rendement d'extraction, l'obtention d'un jus plus clair ayant une proportion réduite des particules grossières. Les enzymes peuvent être utilisées soit lors du traitement de la purée, soit pour la clarification du jus de goyave. Dans les deux cas, l'objectif final est d'obtenir plus de jus de goyave. L'application des pectinases conduit à une réduction de la viscosité et de la turbidité des jus de goyave à chair blanche et pulpes de fruits, aussi bien qu'à une floculation des particules présentes qui peuvent être séparées par sédimentation ou filtration (Alkorta *et al.*, 1998 ; Höhn *et al.*, 2005 ; Jayani *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2006 ; Tapre et Jain, 2014).

En vinification, en plus d'améliorer le rendement de l'extrait aqueux avant la fermentation, le traitement pectolytique de la mâche permet d'améliorer la chromaticité (par l'accélération de l'extraction de la couleur) et de la stabilité (diminution de la turbidité). Les pectinases dégradent les tissus du fruit, accélèrent la diffusion des pigments. De plus, elles sont utilisées pour hydrolyser la pectine qui stabilise les matières en suspension et les empêchent de sédimenter rapidement. Ce traitement antérieur à la préclarification du moût vise à réduire la durée de cette opération avant la fermentation alcoolique (Jayani *et al.*, 2005 ; Höhn *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Autres applications des pectinases

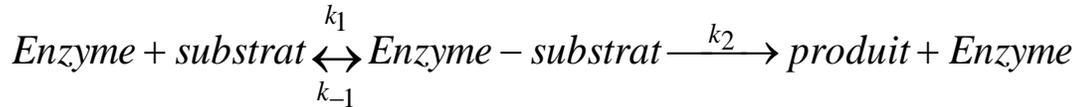
Les pectinases sont utilisées dans les procédés où peuvent intervenir les pectines. Elles sont utilisées dans le décapage du coton, le rouissage des fibres végétales. Elles sont également utilisées dans le traitement des eaux usées des industries de transformation des légumes. Elles sont utilisées dans l'alimentation animale pour réduire la viscosité des aliments, augmenter l'absorption des nutriments, libérer les nutriments. Elles sont utilisées dans l'industrie des papiers pour dépolymériser les pectines pendant la fabrication du papier ; ensuite pour l'extraction des huiles d'agrumes par la destruction des propriétés émulsifiantes de la pectine et par ailleurs dans la purification des virus des végétaux (Jayani *et al.*, 2005).

1.4 QUELQUES NOTIONS SUR LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

1.4.2 La cinétique michaélienne

Les enzymes sont des molécules tridimensionnelles de protéines possédant un site actif à un emplacement précis de la surface. Cette partie de la surface peut être considérée comme une poche qui permettra l'entrée d'un substrat spécifique pour qu'il y ait réaction. D'après Emil Fischer en 1884, au cours de la réaction enzymatique, l'enzyme et le substrat doivent s'ajuster à la manière de la clé et de la serrure au niveau du site actif. Autrement dit, l'enzyme possède un degré élevé de spécificité qui permettait à l'enzyme de ne catalyser qu'une réaction spécifique. La théorie de la clé et de la serrure de Fischer a été modifiée et prend en compte des changements de conformation au niveau du substrat ou plus précisément de l'enzyme. L'enzyme décrit une spécificité vis-à-vis du substrat et décrit également une certaine flexibilité (Uhlir, 1998).

La réaction enzymatique a été considérée comme une réaction unimoléculaire entre l'enzyme et le substrat. Elle peut se résumer aux réactions suivantes :



Les facteurs k_1 , k_{-1} et k_2 étant les constantes de formation du complexe enzyme – substrat, de libération du substrat et de libération du produit, respectivement.

Prenant en compte le postulat de Fischer, Michaelis et Menten formulèrent que la conversion d'un substrat donné nécessite un contact physique intime entre le substrat et l'enzyme au cours de la phase dite initiale. Au cours de cette phase, il y a accumulation de complexes enzyme-substrat et la concentration en enzyme libre diminue. Cette phase initiale est suivie de la phase stationnaire au cours de laquelle la concentration du complexe enzyme – substrat atteint un équilibre dynamique. La formation et la dissociation du complexe enzyme – substrat sont en équilibre. Durant cette phase, la disparition du substrat et la formation du produit suivent un profil linéaire (ordre zéro), tandis que la concentration du complexe enzyme – substrat demeure pratiquement constante. Etant donné que la vitesse de la réaction dépend directement de la concentration du complexe, la variation de la concentration du complexe et celle de l'enzyme avec le temps peuvent être considérées comme égales à 0 (Uhlig, 1998 ; Bisswanger, 2008). Après écriture et réarrangement des équations de disparition du substrat, de formation du produit et du complexe enzyme – substrat, Michaelis et Menten ont obtenu le modèle dit de Michaelis – Menten dont l'expression est décrite par l'Equation 1 :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Équation 1}$$

Avec : v : la vitesse de réaction ; $[P]$: la concentration en produit ; $[S]$: la concentration en substrat ; t : le temps de réaction ; V_{\max} : la vitesse maximale de la réaction et K_M : constant de Michaelis qui représente la concentration du substrat pour laquelle la vitesse est la moitié de la vitesse maximale.

1.4.3 La coopérativité et l'allostérie ou allostérisme

Plusieurs enzymes sont composées de sous-unités distinctes souvent identiques et possédant chacune un site catalytique. Si les sites sont identiques et indépendants les uns des autres, la présence d'un substrat à un site n'aura aucun effet sur la fixation du substrat et les propriétés catalytiques des autres sites. Ainsi, le processus catalytique d'une enzyme à plusieurs sites peut être décrit par les modèles mathématiques applicables à celui d'une enzyme à un seul site de fixation (Marangoni, 2003). Toutefois, certains problèmes liés à la stabilité des enzymes peuvent avoir pour effet la déviation du comportement hyperbolique de la cinétique. Un profil sigmoïdal peut être observé (Cárdenas, 2013). Deux types de phénomènes peuvent être entre autres responsables de cette déviation : la coopérativité et l'allostérie (Section 2.3.2.1).

Deux modèles permettent d'expliquer les phénomènes de coopérativité et d'allostérie : le modèle séquentiel à interaction (Figure 8) et le modèle à symétrie concertée (Figure 9). Dans le premier modèle, toute fixation d'une nouvelle molécule de substrat/ligand entraîne une modification conformationnelle des sites vacants conduisant à la fixation d'une nouvelle molécule substrat/ligand. Ce phénomène est observé dans le cas d'une coopérativité positive. La vitesse de la réaction tient compte de toutes les réactions de fixation du substrat sur l'enzyme et prend en compte les constantes de chacune des réactions. A l'équilibre, la constante de dissociation (macroscopique ou globale) est fonction de chacune des constantes de dissociation de tous les complexes (enzyme-substrats) formés (constantes microscopiques ou intrinsèques). Les constantes de dissociation peuvent diminuer dans le cas d'une coopérativité positive (affinité élevée de l'enzyme pour le substrat) ou augmenter dans le cas d'une coopérativité négative (faible affinité de l'enzyme pour le substrat) (Marangoni, 2003 ; Leskovac, 2003).

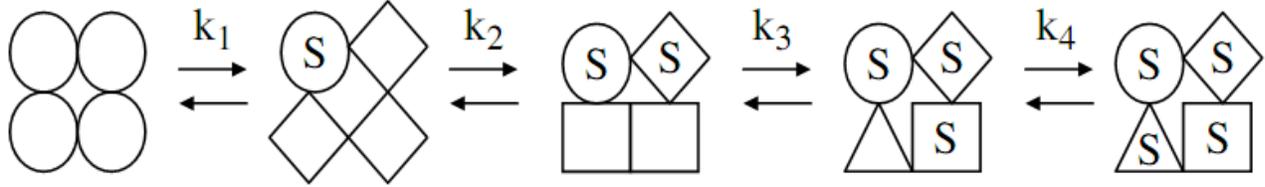


Figure 8: Représentation schématique du mécanisme de coopérativité/allostérie à interaction séquentielle pour une enzyme disposant de quatre sites de fixation. S représente la molécule de substrat ou le ligand. Les constantes k représentent les constantes microscopiques de dissociation pour les quatre sites respectifs de fixation (Source : Marangoni, 2003).

Dans le cas du modèle à symétrie concertée encore appelé « modèle allostérique », la régulation de la conformation est la spécificité majeure. Il existe, en absence de tout ligand, un équilibre entre deux états (conformations) connus sous le nom d'état R ("relâché") qui a une forte affinité avec le substrat et état T ("Tendu") qui a une faible affinité avec le substrat. Pour ce modèle, chaque enzyme est constituée de protomères identiques occupant des positions équivalentes dans la structure de l'enzyme de telle sorte que cette dernière présente un axe de symétrie. Un protomère est une unité structurale qui contient un site unique de fixation pour chaque ligand spécifique. Tous les protomères de l'enzyme doivent être dans la conformation R ou T ; la combinaison des deux conformations n'est pas tolérée. L'affinité de fixation d'un ligand spécifique dépend de la conformation de l'enzyme (R ou T) et non de l'occupation du site voisin. Les différents ligands se lient préférentiellement à l'un des deux états et perturbent de ce fait l'équilibre entre eux. Par la suite, toutes les sous-unités d'une protéine monomérique changent entre les états R et T de manière concertée ; par conséquent, la symétrie est maintenue (Bisswanger, 2008 ; Marangoni, 2003 ; Cárdenas, 2013).

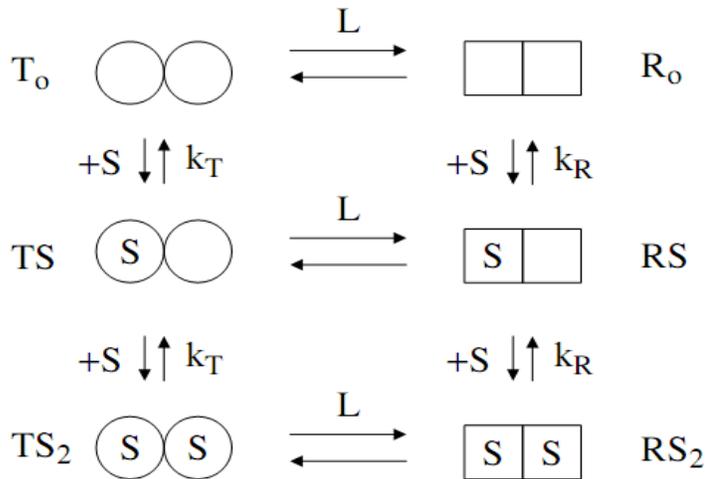


Figure 9: Représentation schématique du modèle à symétrie concertée pour une enzyme allostérique à deux sites de fixation du substrat. R et T représentent les états relaxes et tendus respectivement ; S : le substrat ; L : la constante d'équilibre entre les deux conformations ; les constantes k représentent les constantes de dissociation de chaque complexe enzyme-substrat (Source : Marangoni, 2003).

Les deux modèles peuvent être décrits par plusieurs expressions mathématiques exprimant l'évolution de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat, les plus connus sont les modèles de Hill, d'Adair et de Pauling. Ils ont été établis pour décrire le comportement de la courbe de fixation de l'oxygène par l'hémoglobine.

Le modèle de Hill a été développé par A.V. Hill en 1910. Il avait émis comme postulat que plusieurs (n) molécules d'oxygène se lient simultanément à une molécule d'hémoglobine (Bisswanger, 2008). Il a dérivé une équation dite Equation de Hill (Equation 2) qui décrit la courbe sigmoïdale observée avec l'hémoglobine et qui a pour forme :

$$r = \frac{n[A]^n}{K_d + [A]^n} \quad \text{Équation 2}$$

Avec r la quantité d'oxygène fixé par unité de temps ; $[A]$ la concentration en hémoglobine ; n le nombre de sites de fixation et K_d représente la constante prenant en compte les constantes de dissociation de chacun des complexes formés.

Dans le cas de la cinétique enzymatique, r est remplacé par la vitesse de la réaction ; $[A]$ représente la concentration en substrat et K_d représente la constante de Hill qui a pour unité concentrationⁿ.

A la suite de Hill, G.S. Adair a prouvé que l'hémoglobine est constituée de quatre sous-unités. Il a pu montrer que d'une part, le nombre de sites de fixation ne pouvait être obtenu à partir de la courbe de gradient de Hill, et d'autre part, l'Equation de Hill ne pouvait suffisamment décrire les relations de fixation. Le modèle de Hill ne considère pas que les différents sites de la macromolécule sont occupés successivement suivant une série d'étapes réactionnelles individuelles. Il suggère la fixation simultanée de toutes les molécules d'oxygène, et élimine de ce fait la formation d'un complexe intermédiaire. La saturation de l'hémoglobine est obtenue en une seule étape. Le modèle d'Adair suggère la formation des complexes intermédiaires à chaque fixation d'une molécule d'oxygène. L'Equation générée par Adair prend en compte les différents complexes formés et les différentes constantes de dissociation associées (Bisswanger, 2008). Dans le cas des enzymes coopératives possédant n sites de fixation, l'Equation d'Adair (Equation 3) se présente sous la forme suivante :

$$v = \frac{\frac{[S]}{K'_1} + \frac{2[S]^2}{K'_1K'_2} + \frac{3[S]^3}{K'_1K'_2K'_3} + \dots + \frac{n[S]^n}{K'_1K'_2K'_3\dots K'_n}}{1 + \frac{[S]}{K'_1} + \frac{[S]^2}{K'_1K'_2} + \frac{[S]^3}{K'_1K'_2K'_3} + \dots + \frac{[S]^n}{K'_1K'_2K'_3\dots K'_n}} \quad \text{Equation 3}$$

Avec v : la vitesse de la réaction ; $[S]$: la concentration en substrat, n : le nombre de sites de fixation ; et les constantes K_i 'représentent les constantes de dissociation pour chaque complexe enzyme – substrat formé.

L'Equation d'Adair n'est pas le plus souvent utilisé pour ajuster des données expérimentales, car les constantes ne peuvent pas être déterminées directement (Bisswanger, 2008).

Le modèle de Pauling a été élaboré en 1935 par Linus Pauling. Il considéra également que la macromolécule était constituée de sites identiques de fixation avec une constante uniforme K_d . Il supposa que la sous-unité occupée par un ligand induit un effet stabilisant sur les autres sous-unités libres de la macromolécule. En prenant en considération le facteur d'interaction a et en faisant des arrangements de l'Equation d'Adair, Pauling a obtenu l'expression de la vitesse de la réaction suivante en fonction de la concentration en substrat pour une enzyme ayant quatre sites de fixation (Equation 4) :

$$v = \frac{\frac{4[S]}{K_d} + \frac{12a[S]^2}{K_d^2} + \frac{12a^3[S]^3}{K_d^3} + \frac{4a^6[S]^4}{K_d^4}}{1 + \frac{4[S]}{K_d} + \frac{6a[S]^2}{K_d^2} + \frac{4a^3[S]^3}{K_d^3} + \frac{a^6[S]^4}{K_d^4}} \quad \text{Équation 4}$$

Avec v : la vitesse de la réaction ; $[S]$: la concentration en substrat, a : le facteur d'interaction ; et la constante K_d représente la constante de dissociation pour chaque complexe enzyme – substrat formé.

1.5 LA CENTRIFUGATION

1.5.1 Définition

La décantation centrifuge (ou centrifugation) se définit comme l'opération unitaire de séparation mécanique qui permet de séparer un mélange de deux phases liquides ou d'une phase solide en suspension dans une phase liquide, ou, éventuellement de deux phases liquides contenant une troisième phase solide, sous action de la force centrifuge sur les constituants (Koller, 2009). Elle est utilisée pour la séparation des phases, la collecte des précipités, et la sédimentation des macromolécules. La séparation des composés est basée sur les différences de granulométrie, de forme ou de densité. Les particules sont soumises à des forces centrifuges qui les font se déplacer de manière radiale à travers le liquide vers l'extérieur ou vers l'intérieur, selon qu'elles soient plus ou moins denses (plus lourdes ou plus légères) que le liquide. La centrifugation peut être considérée comme une extension de la sédimentation gravitaire (Svarovsky, 2000).

1.5.2 La sédimentation gravitaire

Elle dépend de la différence de densité entre plusieurs solides en suspension ou entre le milieu de suspension et la particule. Généralement, la force de gravité est l'unique force motrice pour la séparation. Lorsqu'un solide est en suspension, une *force externe*, F_e , agit sur lui pour qu'il se déplace dans la direction de la force. Cette force peut être une force gravitaire ; et dans ce cas, elle entraînera un mouvement vers le bas de la particule. Elle peut également être une force centrifuge, et elle entraînera le mouvement vers le centre de rotation. De plus, une *force d'Archimède*, F_b , agit dans la direction opposée à la force externe. Elle représente la masse de fluide déplacée par la particule solide multipliée par l'accélération générée par la force externe. Une dernière force existe, la *force de trainée*, F_d ; celle-ci est due au déplacement de la particule

en suspension et agit dans la direction opposée à celle d'écoulement du solide. La force de trainée est en fait la résistance du fluide au mouvement de la particule. La composante dans la direction du mouvement du solide de la *force nette* F_t agissant sur la particule va obéir à l'équation d'équilibre de force. La vitesse de chute limite v_t est la vitesse à laquelle la sédimentation se déroule à une vitesse constante. A cette vitesse, la force nette est nulle et la vitesse relative v_r est égale à la vitesse v_t et l'écoulement du fluide autour de la particule est laminaire. En remplaçant les composantes de chaque force par son expression, en considérant une particule sphérique, le remplacement de m par le produit du volume par la masse volumique permet d'obtenir l'Equation 5 valable pour un régime d'écoulement laminaire :

$$v_t = \frac{a_e \times (\rho_p - \rho) \times d^2}{18 \times \mu} \quad \text{Équation 5}$$

Avec : v_t : la vitesse de chute limite, μ : la viscosité du fluide ; d : le diamètre de la particule ; ρ la masse volumique du fluide ; a_e : l'accélération due à la force externe ; ρ_p : la masse volumique de la particule.

L'Equation 5 est connue sous le nom de la *loi de Stokes*. Dans le cas de la sédimentation gravitaire, $a_e = g$, g étant l'accélération de la pesanteur. Dans le cas de la sédimentation centrifuge, $a_e = \omega^2 \times r_c$. ω étant la vitesse angulaire de rotation et r_c , le rayon de rotation. En remplaçant a_e par $\omega^2 \times r_c$ dans l'Equation 5, l'Equation 6 pourrait être obtenue :

$$v_t = \frac{\omega^2 \times r_c \times (\rho_p - \rho) \times d^2}{18 \times \mu} \quad \text{Équation 6}$$

1.5.3 La sédimentation centrifuge

La sédimentation centrifuge consiste à soumettre un mélange soit de liquides non miscibles ou solide-liquide à un champ centrifuge afin d'accélérer la sédimentation des phases plus denses. Les objectifs de la séparation peuvent être multiples. Il peut s'agir d'obtenir un solide aussi concentré que possible ; dans ce cas, il s'agit de l'épaississement. Dans le cas de la clarification, l'objectif principal est d'obtenir un liquide aussi clair que possible. Si l'objectif est l'obtention d'une phase légère pure dans le cas d'une émulsion, il s'agit de la purification. Si c'est la pureté de la phase lourde qui est visée, il s'agit de la concentration ou de l'écémage. Selon ces objectifs, la séparation peut se faire suivant deux mécanismes : la décantation centrifuge et l'essorage centrifuge. Dans la décantation centrifuge ou sédimentation centrifuge, la séparation des phases est fondée sur les différences de densité des constituants soumis au champ centrifuge. Les particules dispersées de solide, ou la phase la plus lourde s'accumule à la paroi du bol, en couches successives selon la densité, tandis que le liquide clarifié reste à l'intérieur de la centrifugeuse. Cette opération obéit aux mêmes principes que ceux de la décantation statique ; le champ de la pesanteur est remplacé par un champ de forces beaucoup plus intense, ce qui permet de réduire la durée de la séparation et d'en augmenter le rendement. Au cours de l'essorage centrifuge, sous l'action d'un champ centrifuge, la séparation est obtenue après passage de la phase liquide au travers d'une membrane filtrante qui retient la phase solide (Koller, 2009).

1.5.4 Les différents types de centrifugeuses-décanteuses continues

Il existe deux grands types de centrifugeuses : les centrifugeuses qui fonctionnent suivant le mécanisme de la décantation centrifuge (solide-liquide ou liquide-liquide), et les centrifugeuses qui fonctionnent suivant le mécanisme de l'essorage centrifuge (pour la séparation solide-liquide). Ces deux types peuvent être subdivisés en plusieurs sous-types selon la méthode de décharge des

solides. Cette méthode peut être discontinue, continue ou une combinaison des deux. D'autres types de subdivision existent selon qu'il s'agisse d'une centrifugeuse de laboratoire ou d'une centrifugeuse industrielle continue (Dahlstrom *et al.*, 1999 ; Richardson et Harker, 2002). Le choix entre ces deux types de centrifugeuse pour une application particulière dépend de la nature de l'alimentation et des exigences du produit à obtenir. En règle générale, la sédimentation centrifuge est utilisée lorsque l'objectif recherché est d'obtenir un produit clarifié, alors que l'essorage permet d'obtenir un solide pur et sec (Richardson et Harker, 2002 ; Koller, 2009). L'objectif recherché étant de clarifier le jus de goyave, une attention particulière sera accordée aux centrifugeuses-décanteuses continues reposant sur le principe de la sédimentation dont plusieurs modèles existent. Plusieurs travaux dans la littérature ont mis en évidence la possibilité de prédire la performance de séparation d'une centrifugeuse continue à partir de celle d'une centrifugeuse de laboratoire (Mayburry *et al.*, 2000 ; Boychun *et al.*, 2004).

1.5.4.1 Les centrifugeuses-décanteuses continues à bol tubulaires

La centrifugeuse-décanteuse continue à bol tubulaire consiste en un tube vertical ayant un ratio longueur/diamètre élevé (6 mm/mm) et qui tourne à une vitesse élevée (plus de 13 000 g) autour de son axe vertical. Dans ce type de centrifugeuse continue, le bol est suspendu à un support supérieur et un dispositif d'entraînement (moteur ou turbine électrique) à travers une broche à transmission flexible munie d'un guide lâche dans un dispositif d'amortissement contrôlé en dessous (Figure 10) (Dahlstrom *et al.*, 1999 ; Svarovsky, 2000).

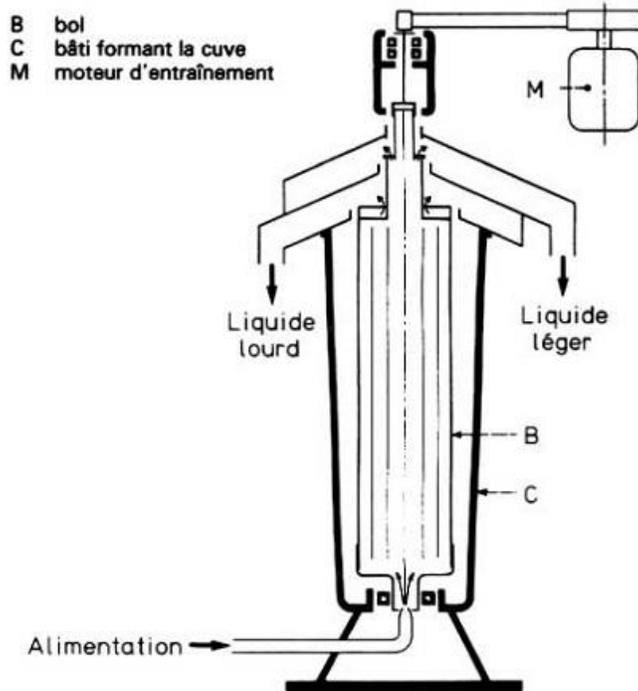


Figure 10: Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à bol tubulaire (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).

L'écoulement dans la centrifugeuse-décanteuse à bol tubulaire est essentiellement axial à l'exception des zones immédiatement adjacentes à l'entrée et à la sortie. Le mélange est introduit au niveau de la portion inférieure du bol à travers un injecteur. Immédiatement après l'injecteur se trouvent un distributeur et un assemblage qui distribuent et accélèrent la suspension à la vitesse de rotation du bol. Le liquide clair se décharge à partir de l'extrémité supérieure du bol par écoulement au-dessus d'une barrière annulaire. Les solides sédimentés à la paroi du bol sont enlevés manuellement de la centrifugeuse lorsque leur quantité dans le bol est suffisante et commence à affecter la limpidité du surnageant (Dahlstrom *et al.*, 1999).

1.5.4.2 La centrifugeuse-décanteuse continue à bol à chambres concentriques

Alors que les centrifugeuses tubulaires ont un rapport longueur/diamètre de 5 à 7, les centrifugeuses à bol à chambres concentriques ont un rapport inférieur ou égal à 1. Le bol entraîné par le bas comprend une série de sections tubulaires courtes de diamètre croissant (300 et 1000 mm) rangées de manière à former un passage tubulaire continu pour l'écoulement du liquide. La suspension est alimentée par la partie supérieure soit par gravité, soit sous pression, dans la chambre de plus petit diamètre. La phase liquide circule successivement de haut en bas et de bas en haut, de chambre en chambre, et est évacuée vers le centre soit par débordement, soit par une turbine centripète. Les particules denses et grosses sédimentent dans les chambres de petit diamètre, tandis que les particules plus fines et petites sédimentent au niveau des chambres de grand diamètre. L'évacuation de ces particules se fait de façon discontinue. Ce type de centrifugeuse est plus utilisé pour la clarification des jus de fruit, du mout et de la bière (Robatel et Borel, 1989b ; Dahlstrom *et al.*, 1999). La Figure 11 donne une représentation schématique d'une centrifugeuse tubulaire.

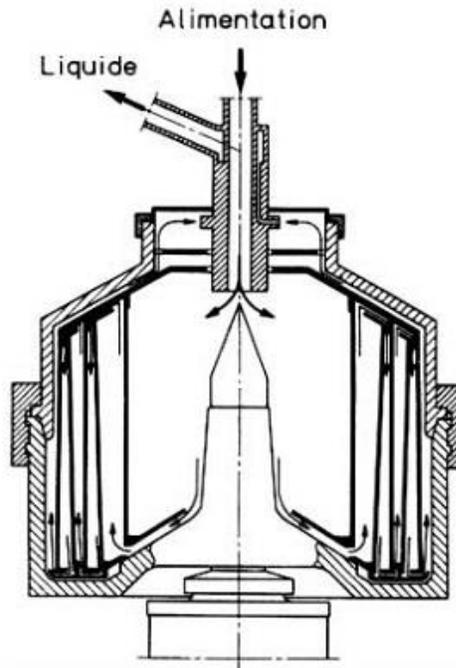


Figure 11: Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à bol à chambres concentriques. (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).

1.5.4.3 Les centrifugeuses-décanteuses continues à axe vertical muni de couteau ou racloir

Elles sont généralement du type suspendu en trois points et comportent soit un entraînement par moteur électrique à plusieurs vitesses (en général trois), soit un entraînement par moteur électrique ou hydraulique à vitesse variable. Le bol possède, à sa partie inférieure, des orifices de déchargement du solide et la cuve porte un mécanisme de déchargement appelé couteau ou racloir (Figure 12).

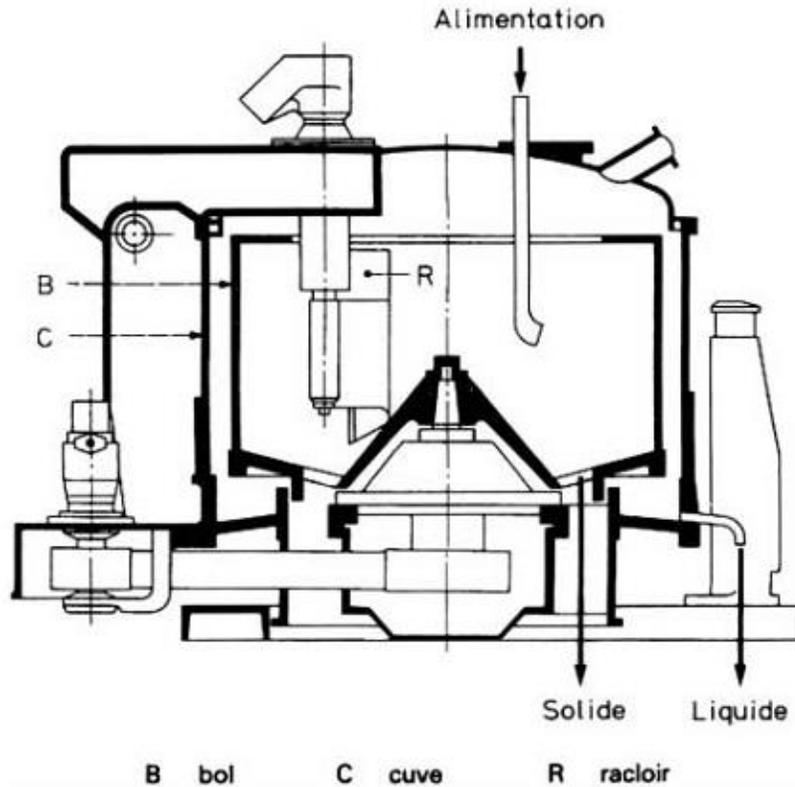


Figure 12 : Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à axe vertical et à racloir (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie)

Lors du fonctionnement, par cycles pouvant être automatisés, l'alimentation s'effectue en continu pendant la première phase du cycle, le liquide clarifié s'évacuant au moyen d'un tube siphon généralement appelé sucette, les sédiments s'accumulent progressivement contre la paroi intérieure du bol. En fin de chargement et après élimination du liquide surnageant, la centrifugeuse est ralentie jusqu'à une faible vitesse (entre 10 et 50 tr/min) et le solide est déchargé par le racloir à travers les orifices situés dans la partie inférieure du bol. La commande du racloir s'effectue soit manuellement, soit, plus généralement, par un dispositif hydraulique dans le cas de centrifugeuses automatiques à programmes (Robatel et Borel, 1989b).

1.5.4.4 Les centrifugeuses-décanteuses continues à axe horizontal muni de couteau ou racloir

L'alimentation entre à travers l'extrémité de l'orifice alloué à cet effet et est accélérée à la vitesse de consigne avant d'être introduite dans la chambre de séparation (Figure 13).

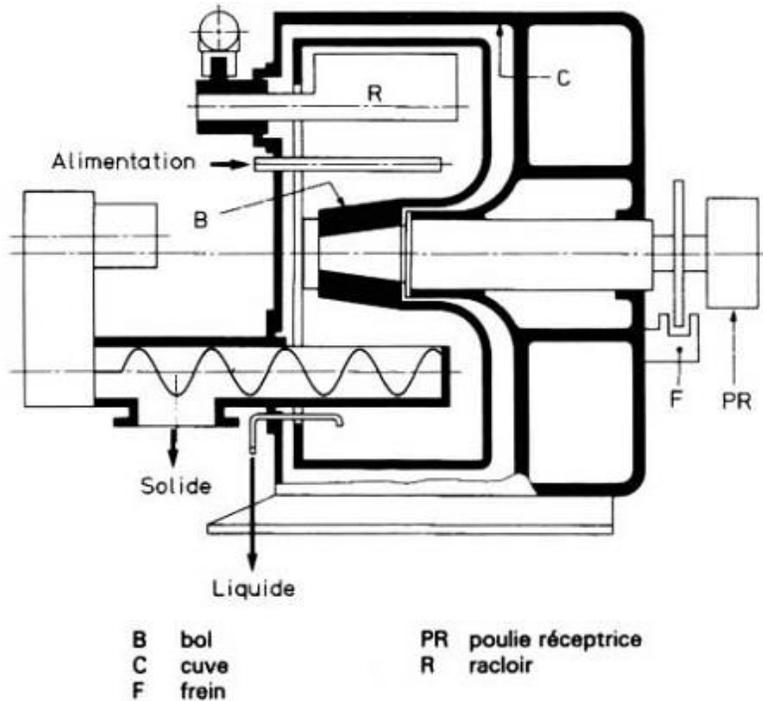


Figure 13: Représentation schématique d'une centrifugeuse-décanteuse continue à axe horizontal et à racloir (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie)

Les solides sédimentent au niveau de la paroi du bol et le liquide clarifié déborde l'anneau ou est déchargé à travers la vanne d'écumage. A la fin d'un cycle (due à l'accumulation à l'intérieur du bol d'une quantité suffisante de solide) signalée par un outil de détection de l'épaisseur du gâteau, le surnageant qui est resté au-dessus du gâteau, est écumé en ouvrant la vanne d'écumage par rotation vers l'intérieur. Après que le liquide ait été aspiré, le gâteau qui en

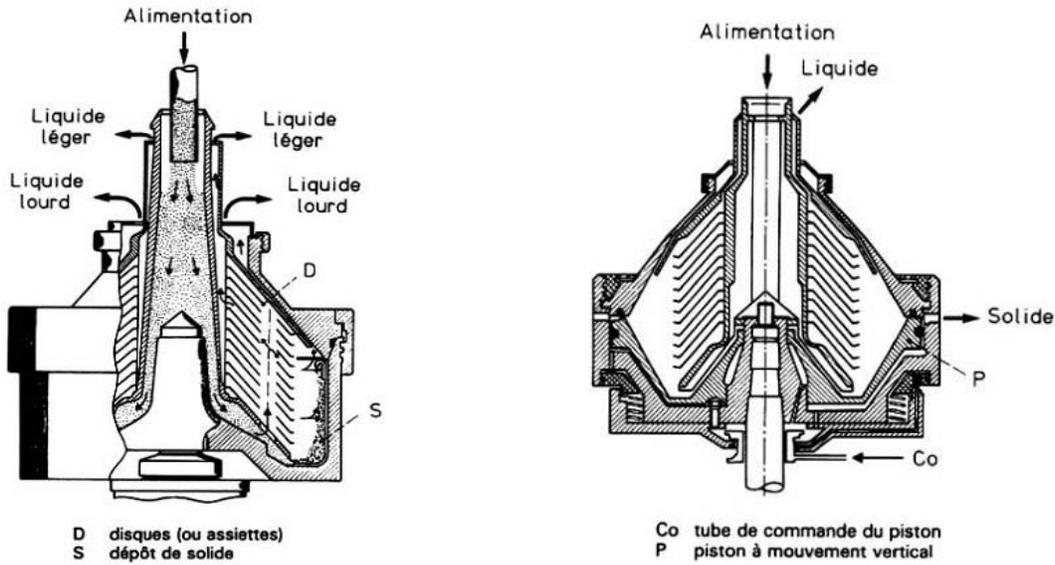
résulte est plus asséché. Ces solides sont enlevés par des racloirs (Dahlstrom *et al.*, 1999 ; Svarovsky, 2000 ; Richardson et Harker, 2002).

1.5.4.5 Les centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes

La centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes est l'un des types de centrifugeuse-décanteuse les plus populaires. Elle contient un assemblage d'assiettes coniques. L'alimentation est introduite dans le bol via un tube d'alimentation fixe débouchant dans un distributeur qui va l'accélérer à la vitesse du bol. La conception du distributeur est telle qu'il puisse assurer l'accélération en douceur du produit afin d'éviter un impact violent des forces de cisaillement sur les particules. La séparation s'effectue entre les assiettes. Le flux entrant est divisé en de nombreuses couches minces créées par l'empilement d'assiettes ; ce qui permet d'obtenir une grande surface de séparation. A la sortie de la pile d'assiettes, le liquide clarifié est repris par une turbine centripète pour être évacué. Selon le procédé, le liquide peut être évacué sous pression ou non (Flottweg, sd).

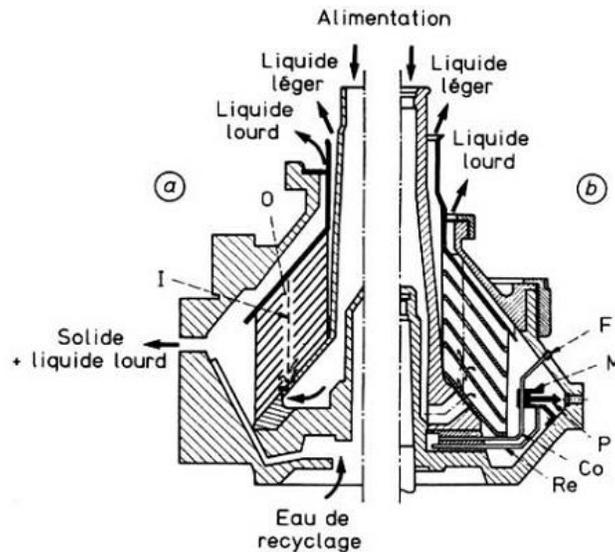
Il existe trois configurations de centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes selon le mode d'évacuation de la phase solide (Figure 14). Pour la centrifugeuse continue à bol plein ou à décharge manuelle, les solides s'accumulent progressivement contre la paroi. Leur évacuation nécessite l'arrêt, le démontage du bol, son nettoyage et l'enlèvement de l'assemblage d'assiettes. Dans la configuration continue à bol autodébourbeur ou à décharge intermittente, les solides ou sédiments accumulés contre la paroi sont éjectés par des anneaux de réglage fixe ou variable. Un système hydraulique fonctionne comme un pointeau ou piston coulissant et automatiquement éjecte de façon périodique les solides à la vitesse maximale de rotation à travers un cyclone à solides qui peut être optionnel. Enfin, dans la configuration continue à bol à buses ou à embouchures ou à décharge continue, les solides sont évacués continuellement avec une partie du

liquide à travers des embouchures placées à la périphérie du bol et qui sont profilées au bout offrant un espace (chambre à boues) pour le stockage des boues (Robatel et Borel, 1989b ; Dahlstrom *et al.*, 1999 ; Flottweg, sd).



(a)

(b)



Ⓐ évacuation continue (bol à embouchures)

Ⓑ évacuation semi-continue (bol autodébourbeur à buses télécommandées)

Co tube de commande

F fuite calibrée

I interface liquide-liquide

M piston de manœuvre du pointeau

O orifices d'alimentation des disques

P pointeau

Re tube de refoulement

(c)

Figure 14: Représentation schématique des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes. (a) à bol plein ; (b) à bol autodébourbeur à ouverture par piston ; (c) à bol à buses ou à embouchures (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).

Certaines centrifugeuses à décharge continue comportent un dispositif de recyclage partiel de la phase solide à proximité des buses, ce qui permet d'accroître la concentration en solide de la boue évacuée (Robatel et Borel, 1989b ; Dahlstrom *et al.*, 1999 ; Flottweg, sd).

1.5.4.6 Le décanteur centrifuge continu à vis

Parmi les centrifugeuses industrielles modernes, le décanteur centrifuge continu à vis est celle qui a le plus grand nombre d'applications. Le décanteur centrifuge continu consiste en un bol solide muni d'une vis convoyeuse entre les têtes de bols pour solides et liquide (Figure 15). Le bol et la vis convoyeuse tournent mais à des vitesses différentes de manière à permettre l'acheminement des sédiments le long de la machine vers le cylindre à l'issue conique de décharge. La suspension à séparer est introduite dans le décanteur par une vanne d'alimentation axiale localisée au centre de la vis. Le produit est progressivement accéléré dans la chambre de distribution avant d'être introduit dans le bol par des orifices appropriés dans la chambre de séparation. Dans celle-ci, la suspension tourne avec le bol à la vitesse de fonctionnement et forme une couche concentrique sur la paroi interne du bol. Les particules solides contenues dans la suspension sont plaquées contre la paroi du bol sous l'effet de la force centrifuge. Le liquide clarifié se déplace de manière radiale vers la surface de la chambre. Le liquide s'écoule par la suite le long du canal d'hélice formé par les lames adjacentes de la vis convoyeuse, vers la tête du bol à liquide. C'est à partir de cette tête que le liquide sera déchargé au dessous des anneaux. Le liquide clarifié reflue vers l'extrémité cylindrique du bol et déborde par-dessus le jeu d'anneaux déversoirs. Le liquide est recueilli dans le centrât et évacué par gravité. Il peut également être

évacué par une turbine centripète ; cela se fait sous pression et ne nécessite pas l'utilisation d'une pompe de reprise séparée. Les solides séparés sont acheminés par la vis convoyeuse et évacués à l'extrémité conique du bol dans le collecteur de sédiments puis tombent par gravité, dans la trémie d'évacuation (Dahlstrom *et al.*, 1999 ; Svarovsky, 2000 ; Flottweg, sd).

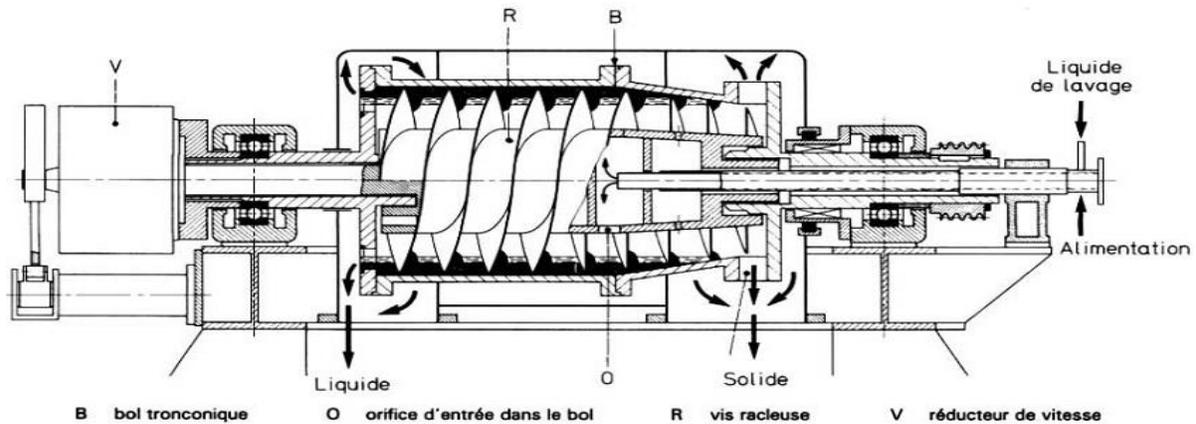


Figure 15: Représentation schématique d'un décanteur centrifuge continu à vis racleuse (Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des Procédés, Chapitre A5560, Centrifugation – Technologie).

1.5.4.7 Le décanteur centrifuge continu à tamis

Il consiste en un décanteur centrifuge continu à vis auquel un tamis cylindrique a été ajouté à la petite extrémité conique (Figure 16). La vis convoyeuse s'étend le long du bol. Ce type de centrifugeuse est une combinaison d'une décanteuse et d'uneessoreuse. L'alimentation est semblable à celle d'un décanteur centrifuge à vis. A l'intérieur de la chambre de séparation, les solides denses sédimentent au niveau de la paroi du bol et l'effluent s'échappe à travers des orifices appropriés au niveau de la large extrémité de la machine. Les sédiments sont acheminés vers un tamis à l'extrémité conique de la machine. Au cours de ce mouvement de sédiments, le liquide est drainé à travers le tamis ; il se forme un gâteau plus sec (Dahlstrom *et al.*, 1999).

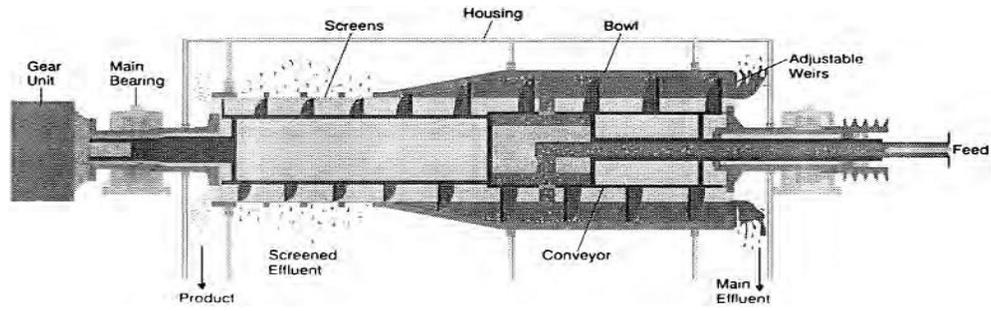


Figure 16: Représentation schématique du décanteur centrifuge continu à tamis. (Source : Perry's Chemical Engineers' Handbook)

CHAPITRE 2

ETUDE DE LA CINETIQUE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE LA PECTINE COMMERCIALE ET DE LA PECTINE DE GOYAVE

CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA CINETIQUE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE LA PECTINE COMMERCIALE ET DE LA PECTINE DE GOYAVE

RESUME DU CHAPITRE

L'objectif de ce chapitre est de déterminer le mécanisme de dépectinisation enzymatique de la purée de goyave à chair blanche. A cet effet, une étude de la dégradation de la pectine commerciale et de la pectine de la purée de goyave à chair blanche a été faite. L'effet de la concentration en pectine commerciale sur la vitesse de réaction a été évalué. La cinétique ainsi obtenue a été ajustée par le modèle cinétique de Hill et les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) ont été estimés. L'étude de la cinétique de dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche a nécessité la préparation de ladite purée par broyage de la pulpe et mélange du broyat avec de l'eau à une proportion de 35% m/m. Les concentrations en pectinases variaient de 0,033% à 0,100% m/m et le temps de contact enzyme-purée variait de 3 à 90 min. La température de dépectinisation était de $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Le taux d'hydrolyse et la vitesse de réaction ont été déterminés pour chaque condition opératoire. La cinétique de dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche a été ajustée à l'aide du modèle de Hill et les coefficients du modèle ont été estimés. Les résultats obtenus ont montré que la cinétique de dégradation de la pectine commerciale a pu être décrite à l'aide du modèle de Hill avec un coefficient de détermination de 0,997. Le nombre de Hill pour ce modèle a été évalué à 1, ramenant ledit modèle à celui de Michaelis-Menten. Les valeurs estimées de K_M et de V_{max} étaient de 1148,50 mg/L et 0,017 $\mu\text{mol/L/min}$. Le taux d'hydrolyse de la pectine de goyave à chair blanche a montré une augmentation considérable pendant les 20 premières minutes de traitement pour les concentrations de 0,055% et 0,078%, et la 3^{ème} minute pour la concentration de 0,100%. Cette phase d'augmentation notable était suivie d'une augmentation négligeable. La cinétique de dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche décrit une forme sigmoïdale pour toutes les concentrations en enzyme. La valeur de V_{max} augmentait de façon linéaire avec la concentration en enzyme de 60 à 280 mg/L/min, alors que le coefficient de Hill (n) diminuait de 7 à 4 avec l'augmentation de la concentration en enzyme.

2.1 INTRODUCTION

La purée fraîche de goyave contient une teneur en pectine entre 0,26 et 1,2% m/m (Combo *et al.*, 2011). Au cours du traitement enzymatique de la purée de goyave, sa pectine est hydrolysée en divers produits. Plusieurs travaux de dépectinisation enzymatique de la purée de goyave à chair blanche par les pectinases industrielles d'*Aspergillus niger* existent dans la bibliographie. Sept isoformes de polygalacturonases ont été isolées à partir de cette moisissure. Chacune d'elles a été caractérisée ; les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}), leur mécanisme d'hydrolyse de la pectine et les types de substrats catalysés ont été déterminés. Ces différentes études ont été faites sur des substrats (pectines et oligomères de l'acide galacturonique) en milieu relativement simple (solution tampon) (Benen *et al.*, 2003). Les paramètres cinétiques ont été déterminés en utilisant le modèle de Michaelis-Menten supposant des effets négligeables de la rétroaction ou inhibition par le produit (Cárdenas, 2013). Les préparations commerciales de pectinases d'*A. niger* sont des mélanges des différentes isoformes de polygalacturonases. L'effet conjoint de ces isoformes a été exploité lorsqu'elles ont été appliquées aux pectines extraites de diverses sources (Kiss *et al.*, 2009). Les paramètres cinétiques du mélange sur la pectine préalablement isolée de sa source ont été déterminés par ajustement à l'aide du modèle de Michaelis-Menten. Dans ces diverses sources, la pectine est mélangée à des molécules qui peuvent décrire certaines interactions avec les pectinases utilisées pour la dépectinisation. L'application des préparations des pectinases d'*A. niger* à la purée de goyave à chair blanche entraîne une hydrolyse de la pectine avec diminution de sa teneur au cours du traitement telle que rapportée par Nso *et al.* (1998). Il ressort de ces travaux qu'aucun mécanisme moléculaire de dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche prenant en compte sa complexité n'a été développé. L'objectif de ce chapitre est de déterminer le mécanisme de dépectinisation enzymatique de la purée de goyave à chair blanche. Il s'agira de

déterminer le comportement cinétique des polygalacturonases d'*Aspergillus niger* en milieu simple (pectine pure) et en milieu complexe (jus de goyave). L'hypothèse qui permet de soutenir cet objectif est la suivante : l'hydrolyse enzymatique de la pectine de goyave à chair blanche n'obéit pas au mécanisme classique de Michaelis Menten.

2.2 MATERIEL ET METHODES

2.2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique a été constitué des fruits de goyave à chair blanche (cultivar Lucknow 49) achetés dans le marché de Kharagpur dans l'Etat de la Bengale Occidentale en Inde, auprès d'un commerçant se ravitaillant dans les vergers de la contrée de Baruipur (Coordonnées GPS : 22°21'0.00"N ; 88°26'24.00"E) près de la ville de Calcutta. La Figure 17 présente des images de la goyave de ce cultivar.



Figure 17 : Images de la goyave à chair blanche du cultivar Lucknow 49

2.2.2 METHODES

2.2.2.1. Détermination de l'activité des pectinases

L'activité des pectinases a été déterminée par la méthode au 2 – cyanoacétamide telle que décrite dans le Codex Œnologique International (2012) avec quelques modifications. Le substrat utilisé a été la pectine commerciale extraite à partir d'agrumes. La concentration en pectine a été variée et l'effet de cette variation sur l'activité spécifique des pectinases a été déterminé.

a. Principe

Les pectinases hydrolysent les liaisons α - (1 – 4) galactosidiques de la pectine avec libération dans le milieu des unités de l'acide galacturonique ainsi que des oligomères d'homogalacturonanes. Des extrémités à réactivité réductrice sont par conséquent libérées. Cette méthode a recours aux ultraviolets et au cyanoacétamide et repose sur la réaction de KNOEVENAGEL, à savoir la condensation entre un groupe méthylène actif et un groupe carbonyle dans un milieu fortement alcalin (Rupainwar *et al.*, 2019). Elle permet de déterminer l'activité de diverses enzymes parmi lesquelles les pectinases.

b. Mode opératoire

Pour la détermination de l'activité enzymatique, 9,5 mL de solutions de pectine (extraite à partir de zeste d'agrumes ; degré de méthylation 65% ; pureté 83% m/m) (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, Inde) à différentes concentrations (0 – 1900 mg/L) dans le tampon citrate de sodium (Merck Specialities Private Limited, Mumbai, Inde) (100 mM ; pH 4,0) ont été introduits dans des tubes à essais de 25 mL. Ces tubes à essais ont été par la suite introduits dans un bain-marie (Remi, modèle RSB – 12, Remi Elektrotechnik Ltd, Inde) à $43 \pm 2^\circ\text{C}$ et maintenus pendant 5 minutes. Dans

chaque tube à essais, la réaction a été initiée par l'ajout de 0,5 mL d'extrait enzymatique (Pectinase d'*Aspergillus niger* : 8000 – 12000 U/g) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Inde) (0,02 g/mL). La réaction s'est ainsi déroulée à $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Après 15 minutes de réaction, 500 μL du milieu réactionnel a ensuite été introduit dans des tubes de culture contenant 20 mL d'eau déminéralisée préalablement incubés dans un bain-marie bouillant. Après 10 minutes de chauffage (à $97 \pm 1^\circ\text{C}$) du mélange afin de stopper la réaction enzymatique, suivi du refroidissement à la température ambiante ($30 \pm 3^\circ\text{C}$), la solution a été complétée à 25 mL avec de l'eau déminéralisée. Un volume (2 mL) de cette solution a été prélevé et complété avec 4 mL d'une solution de tampon borate (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, Inde) 0,1 M pH 9,0 et 2 mL d'une solution de 2-cyanoacétamide (Spectrochem Pvt. Ltd. Mumbai, Inde) (1% m/v). Le tube du mélange a été par la suite placé dans un bain marie bouillant ($97 \pm 1^\circ\text{C}$) pendant 10min. Après le refroidissement à la température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 273nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (M/s Perkin Elmer, Connecticut, USA) contre un blanc ayant subi la même procédure, à la seule différence que l'extrait enzymatique a, au préalable, été chauffé à 95°C pendant 10 minutes. La teneur en acide galacturonique (Sigma Aldrich, Slovaquie) a été déterminée en se rapportant à la courbe d'étalonnage en utilisant l'acide galacturonique anhydre à des concentrations de 0 à 250 $\mu\text{g/mL}$.

c. Expression des résultats

L'unité de la vitesse de réaction ou de l'activité de polygalacturonase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) a été exprimée comme étant la quantité d'acide galacturonique (en $\mu\text{mol/L}$) libérée par unité de temps (en minutes) ; le facteur de correction du volume a été de 50. Cette vitesse de réaction a été obtenue à l'aide la formule (Equation 7) (Codex Œnologique International, 2012) :

$$V(\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \frac{(Abs_{éch} - Abs_{blanc})}{\alpha \times t} \times 50 \quad \text{Équation 7}$$

Avec : V : Vitesse de la réaction enzymatique en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$; α : la pente de la courbe d'étalonnage en L.mg^{-1} ; t : le temps de réaction en min ; $Abs_{éch}$ et Abs_{blanc} : l'absorbance du tube contenant l'extrait enzymatique non inactivé et du tube contenant l'extrait enzymatique préalablement inactivé, respectivement.

2.2.2.2 Traitement préliminaire des fruits de goyave à chair blanche

Les goyaves à chair blanche du cultivar Lucknown 49 ont été réceptionnées à la maturité physiologique. Le critère de détermination a été la couleur de la peau ; la couleur des fruits était la couleur verte pâle. Des travaux réalisés sur ce cultivar par Jain et al. (2001), et Phani Deepthi et Chandra Sekhar (2015) ont permis de retenir cet état de maturité pour procéder au processus de mûrissement et de sénescence. Cet état de maturité a permis de transporter les fruits des vergers pour le laboratoire en minimisant les risques de ramollissement et de détérioration liés au transport. Arrivés au laboratoire, les fruits ont subi une opération de triage qui a permis d'éliminer les fruits immatures (couleur de la peau : verte sombre), et les fruits présentant des signes de détérioration. Les fruits ont par la suite été lavés sous un jet d'eau de robinet. Ils ont été émondés de pédoncules et de parties florales. Les fruits ont été conservés dans des emballages en carton garnis de papiers ; ces emballages ont été par la suite scellés par des rubans adhésifs. Le mûrissement a été fait à la température ambiante ($30 \pm 3^\circ\text{C}$). La durée du processus de mûrissement était de 7 – 10 jours. Au cours de cette période, la couleur de la peau des fruits est passée du vert pâle au jaune verdâtre. Au toucher, la surface de contact du fruit avec le doigt s'enfonçait sous l'application d'une pression. De plus, les arômes étaient intenses et les fruits étaient plus sucrés que les fruits à la cueillette. Cette période de conservation, de même que la couleur de la peau ont été choisies en se

référant aux résultats des travaux de Jain et al. (2001), et Phani Deepthi et Chandra Sekhar (2015). Ces chercheurs ont prouvé que c'est pendant cette phase de mûrissement (passage de la couleur de la peau du vert pâle au jaune verdâtre) que des changements physiologiques et biochimiques considérables ont lieu. Il s'agit entre autres de la diminution de la fermeté des fruits ; la diminution de la teneur en chlorophylle et l'augmentation de la teneur en caroténoïdes ; la diminution de la teneur en amidon, en hémicellulose, cellulose et lignine, en pectine ; la diminution de la verdure ; l'augmentation de la couleur jaune ; l'augmentation de la teneur en sucres totaux et en sucres réducteurs ; l'augmentation de l'activité des polygalacturonases, la diminution de l'activité des α – amylase et β – amylase. A l'issue du mûrissement, les fruits ont été retirés des emballages en carton et transférés dans des emballages en chlorure polyvinylique (PVC) pour le processus de préparation du jus de goyave.

2.2.2.3 Préparation du jus brut de goyave

Pour cette préparation, le lot de fruits a subi une opération de triage ; les corps étrangers (fruits présentant des entailles ou des signes de ramollissement, et cailloux, feuilles, pédoncules) ont été écartés du lot. Les fruits ont par la suite été lavés sous un jet d'eau de robinet. Après avoir été épluchés, ils ont été dépépinés par râpage et affinage à l'aide d'un tamis conventionnelle de maille 1,19 mm. La purée a été broyée à l'aide d'un broyeur (Inalsa, Modèle Fiesta, Tuareg marketing Pvt Ltd, Inde). Des travaux préliminaires ont été effectués en variant le ratio masse de purée/masse d'eau (25% m/m à 45% m/m). Ceux-ci ont permis de sélectionner le ratio 35% m/m pour la suite des travaux. Le mélange purée – eau (jus brut de goyave) a été conditionné dans des bouteilles plastique Polyéthylène Téréphtalate (PET) et conservé au congélateur (LG, Inde) à -18°C pour des travaux ultérieurs.

2.2.2.4 Traitement enzymatique du jus brut de goyave

Le jus brut de goyave à chair blanche congelé (à -18°C) a été décongelé. Le traitement enzymatique a été effectué en suivant le protocole développé par Akewan et Choonhahirun (2013) avec quelques modifications. Pour cela, dans un bécher de 250 mL, 100 g de jus brut de goyave à chair blanche ont été pesés à l'aide d'une balance de précision au millième (A & D, Model GF – 300, A & D Company Limited, Japon). Le bécher a été introduit dans un bain-marie à $43\pm 2^{\circ}\text{C}$. Les données de la littérature ainsi que les travaux préliminaires effectués à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $43\pm 2^{\circ}\text{C}$ et $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ ont permis de sélectionner la température de $43\pm 2^{\circ}\text{C}$ pour le traitement enzymatique. A l'aide d'un agitateur à pales (Remi Motor agitator, type RQ 122, Remi Elektrotechnik Ltd, Inde), le jus brut de goyave à chair blanche a été homogénéisé à 1000 rpm pendant 5 minutes pour pré-conditionnement à la température de réaction. L'extrait enzymatique sec (en poudre) a par la suite été ajouté à celui-ci. Des travaux préliminaires effectués avec une concentration en enzyme de 0,01% m/m (masse d'enzyme/masse de purée initiale) n'ont pas permis d'obtenir des changements notables des caractéristiques du jus de goyave issu de la dépectinisation. A cet effet, la dépectinisation a été effectuée avec les ratios de pectinase (% masse d'enzyme/masse de purée initiale) de 0,033% ; 0,055 ; 0,078% et 0,100% m/m. L'extrait enzymatique a été ajouté sous agitation. Après 10 secondes d'homogénéisation permettant de disperser l'enzyme dans le jus de goyave, le temps de contact enzyme-substrat a été chronométré en négligeant ce temps d'homogénéisation. Les temps de réaction sous agitation pour toutes les concentrations en enzyme ont été de 3 min, 5 min, 8 min, 12 min, 15 min, 18 min, 20 min, 40 min, 60 min, 80 min et 90 min, respectivement. Ces valeurs de temps de contact enzyme-purée ont été sélectionnées dans le but d'appréhender le phénomène d'hydrolyse lors des vingt (20) premières minutes de la réaction et de mieux visualiser les changements qui ont eu lieu pendant cette première

tranche de 20 minutes. De plus, les travaux préliminaires ont permis de montrer que des variations négligeables n'étaient observées qu'à partir de la trentième minute pour les concentrations en enzyme ci-dessus mentionnées. Au terme de la durée d'agitation, le jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation a été introduit dans des bocaux en verre, fermé et introduit dans un bain-marie bouillant (95°C) pendant 5 minutes pour arrêter la réaction enzymatique. Le bocal a été refroidi dans un bain-marie à la température ambiante. Le jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation a été essoré à l'aide d'une toile filtrante et le filtrat recueilli et conditionné dans des emballages en polyéthylène téréphtalate (PET) et conservé dans le congélateur pour la suite des travaux. Trois répétitions ont été faites pour chaque combinaison de paramètres (temps et concentration en enzyme) ; la valeur moyenne et l'écart-type ont été calculés.

2.2.2.5 La détermination de la teneur en pectine des échantillons de jus de goyave à chair blanche

La détermination de la teneur en pectine a été faite par la méthode au carbazole telle que développée par McComb et McCready (1952).

a. Principe

La détermination de la teneur en pectine repose sur trois réactions consécutives. La première consiste initialement en une hydrolyse à chaud des molécules de pectine sous l'influence de l'acide sulfurique en des monomères de l'acide galacturonique. Dans la deuxième réaction, les monomères de l'acide galacturonique formeraient avec l'acide sulfurique des produits intermédiaires contenant un groupement carbonyle. Dans la troisième réaction, ces produits intermédiaires vont se combiner avec le carbazole pour donner un complexe rouge violacé ou marron (Dische, 1947).

b. Mode opératoire

– Extraction de la pectine

La détermination de la teneur en pectine a d'abord nécessité une étape préliminaire d'extraction de la pectine des échantillons de goyave à chair blanche. Celle-ci a été réalisée en suivant la méthode décrite par Masmoudi et al. (2008) avec quelques modifications. Pour cela, 10 mL d'échantillon ont été prélevés et introduits dans les tubes de centrifugation de 30 mL. Ce volume a été complété avec 15 mL d'éthanol (Honyon International Inc., Chine) (99% v/v) pour la précipitation de la pectine et autres composés insolubles dans l'éthanol. Le mélange a été agité manuellement et les tubes de centrifugation conservés dans le réfrigérateur à 4°C durant toute la nuit (15 heures). Le mélange a été centrifugé à 10000 rpm pendant 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Remi, Remi Elektrotechnik Ltd, Bengale Occidentale, Inde). Le surnageant a été collecté dans les bocaux en polyéthylène téréphtalate et conservé dans le réfrigérateur pour des analyses ultérieures. Le culot dans les tubes de centrifugation a été lavé avec l'éthanol à 50% v/v, 75% v/v respectivement pour éliminer les mono et les disaccharides. Les précipités ont été mis en suspension dans l'éthanol à 99% v/v et le contenu a été centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été séparé du précipité et a par la suite été utilisé pour la détermination de la concentration en pectine.

– Détermination de la teneur en pectine

La détermination de la teneur en pectine a été effectuée en utilisant la méthode au carbazole telle que décrite par McComb et McCready (1952) avec quelques modifications. Le précipité a été premièrement dissout dans une solution de NaOH (0,05 N) (Merck Specialities Private Limited, Mumbai, Inde) dans une fiole de 100 mL, afin de rompre les liaisons méthoxyls et libérer des

molécules de pectate (pectine dépourvue de groupements méthyliques). Après 30 minutes de réaction, 1 mL d'échantillon dilué au centième a été introduit dans un tube de culture contenant 6 mL d'acide sulfurique concentré (Merck Specialities Private Limited, Mumbai, Inde) (98% v/v) et maintenu dans un bain de glace ($3 \pm 1^\circ\text{C}$). Après fermeture des tubes à essais, ceux-ci ont été agités et introduits dans un bain-marie bouillant à 95°C pendant 10 minutes. Après chauffage, les tubes ont été immédiatement refroidis dans un bain-marie à 20°C . Un volume (0,5 mL) de la solution de carbazole (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, Inde) (0,15% m/v) a été ajouté. Le mélange a été par la suite agité vigoureusement et laissé au repos pendant 30 minutes. La transmittance (%T) des échantillons a été mesurée à 520 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (M/s Perkin Elmer, Connecticut, USA). La teneur en acides galacturoniques issus de la réaction d'hydrolyse acide de la pectine a été obtenue à l'aide d'une courbe d'étalonnage utilisant l'acide galacturonique anhydre comme étalon (0 – 200 mg/L).

Pour la détermination de la teneur équivalente en pectine de l'échantillon, des solutions de pectine à des concentrations connues ont été préparées. Celles-ci ont subi le traitement acide précédemment décrit. Les teneurs en acides galacturoniques de chaque échantillon ont été déterminées. Une courbe d'étalonnage donnant la concentration en acide galacturonique anhydre de chaque solution de pectine en fonction de la teneur correspondante en pectine a été tracée. La teneur en pectine des échantillons de goyave à chair blanche a été déterminée en utilisant cette courbe d'étalonnage.

Pour chaque échantillon, le taux d'hydrolyse (TH) a été calculé à l'aide de l'Equation 8 (Masmoudi *et al.*, 2008) :

$$DH_t(\%) = \frac{([S]_{t=0} - [S]_t)}{[S]_{t=0}} \times 100$$

Équation 8

Avec TH_t : le taux d'hydrolyse au temps de traitement t , $[S]$, la concentration en pectine (mg/L) et t : la durée de traitement.

Pour chaque concentration en enzyme, le taux d'hydrolyse a été tracé en fonction du temps de contact enzyme-substrat.

2.2.2.6 Détermination de la cinétique d'hydrolyse de la pectine

Pour la modélisation de la cinétique de dégradation enzymatique de la pectine commerciale, la vitesse de la réaction de chaque échantillon a été tracée en fonction de la concentration en pectine correspondante.

En ce qui concerne la pectine de goyave, la modélisation de sa cinétique a nécessité une détermination préalable de la vitesse de la réaction pour chaque concentration en enzyme ; celle-ci a été faite en utilisant l'Equation 9 :

$$V(mg.(L.min)^{-1}) = -\frac{[S]_i - [S]_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}$$

Équation 9

Avec : V : Vitesse de la réaction ; $[S]_i$ et $[S]_{i-1}$: la concentration en pectine (en mg/L) de l'échantillon correspondant au temps t_i (en minute) et celle de l'échantillon du temps immédiatement précédent t_{i-1} .

L'évolution de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en pectine (commerciale ou celle de goyave) a été modélisée en utilisant l'équation de Hill (Equation 10) en

se fondant sur l'hypothèse de l'existence d'une multitude de sites de fixation du substrat sur l'enzyme.

$$V(\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}) = V_{\max} \times \frac{[S]^n}{K + [S]^n} \quad \text{Équation 10}$$

Avec V : Vitesse de la réaction ; V_{\max} : la vitesse maximale de réaction ; n : le nombre de sites de fixation ; celui-ci devant être entier, un arrondi à l'unité supérieur ou inférieur selon la partie décimale s'est avéré indispensable. $[S]$: la concentration en pectine (mg/L). K est une constante qui traduit l'affinité de l'enzyme pour le substrat mais qui n'est pas forcément la constante de Michaelis-Menten. K est donné par l'Equation 11 :

$$K = [S_{50}]^n \quad \text{Équation 11}$$

Avec $[S_{50}]$ est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est la moitié de la vitesse maximale.

Si n dans le modèle de Hill est égal à 1, alors ce modèle s'apparente à celui de Michaelis-Menten donné par l'Equation 12. Dans ce cas, K devient la constante de Michaelis-Menten (K_M) (mg/L) qui représente la concentration en pectine pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximale (V_{\max}).

$$V(\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}) = V_{\max} \times \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Équation 12}$$

Le logiciel SigmaPlot version 11.0 a été utilisé pour tracer la courbe de l'activité enzymatique et l'estimation des paramètres cinétiques de modèle de dégradation de la pectine commerciale.

Les valeurs V_{max} et n ont été estimées en minimisant la somme des carrés à chaque point expérimental sous un environnement Matlab 14b. La somme des carrés est donnée par l'Equation 13 suivante :

$$S = \sum_{i=1}^N \left(\frac{v_{exp,i} - v_{sim,i}}{v_{exp,i}} \right)^2 \quad \text{Équation 13}$$

Avec $v_{exp,i}$ et $v_{sim,i}$ les valeurs expérimentales et simulées de la vitesse de réaction au temps i .

Les valeurs V_{max} et n ont respectivement été tracées en fonction des différentes concentrations en enzyme.

2.3 RESULTATS ET DISCUSSION

2.3.1 Modélisation de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la pectine commerciale

La concentration en pectine commerciale varie entre 0 et 1900 mg/L (Figure 18). La vitesse initiale de la réaction augmente de 0 et 0,0108 $\mu\text{mol/mL/min}$ avec l'augmentation de cette concentration (Figure 15). La vitesse initiale augmente en fonction de la concentration en pectine pour celles comprises entre 0 et 1700 mg/L. Pour des concentrations en pectine comprises entre 1700 et 1900 mg/L, la vitesse de la réaction ne varie pas considérablement (présence d'un plateau).

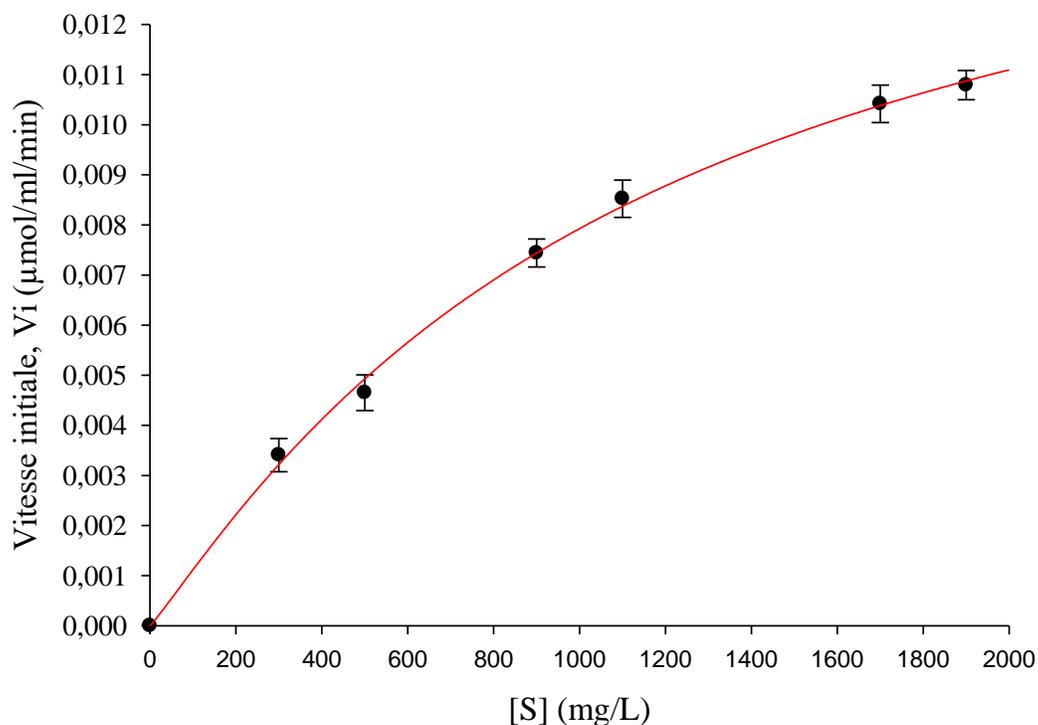


Figure 18: Cinétique de dégradation enzymatique de la pectine commerciale

Afin de déterminer la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en pectine commerciale, sa cinétique de dégradation enzymatique a été modélisée. Celle-ci a été faite en ajustant les données expérimentales à l'aide du modèle de Hill (Equation 10). La courbe continue de la Figure 18 représente celle générée par ledit modèle. Celui-ci suppose une forme sigmoïdale de la courbe de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en pectine. Cette forme a également été décrite par Trindade et al. (2016) dans la modélisation de la cinétique de dégradation de la pectine (26% de degré de méthylation) par l'exo-polygalacturonase de *Rhizomucor pusillus* A13.36. N'ayant pas trouvé dans la littérature de résultats semblables pour effectuer une comparaison, ce profil a pu être justifié par la complexité de la molécule de pectine qui n'était pas un substrat synthétique. Ces chercheurs ont également émis l'hypothèse de la présence dans la molécule de pectine de certaines régions qui poseraient une difficulté initiale pour la réaction d'hydrolyse qui se déroulerait à une faible vitesse de réaction.

La ligne continue rouge représente le modèle cinétique généré par le logiciel SigmaPlot11. Le coefficient de détermination (R^2) obtenu avec le modèle de Hill est de **0,9992** suggérant une corrélation acceptable. Ce modèle permettrait par conséquent de décrire la cinétique de dégradation enzymatique de la pectine commerciale. Les coefficients du modèle estimés par le logiciel SigmaPlot 11 pour cette cinétique ont permis de générer l'Equation 14.

$$V = 0,017 \times \frac{[S]^{1,09}}{[1148,50]^{1,09} + [S]^{1,09}} \quad \text{Équation 14}$$

Avec V : Vitesse initiale de la réaction ($\mu\text{mol/mL/min}$) et $[S]$: la concentration en pectine (mg/L).

La puissance de la concentration en pectine est égale à 1,09 (Equation 14). Cette puissance qui représente le nombre de sites de fixation du substrat, doit être entière. Vue sa partie décimale, elle a par conséquent été arrondie à 1. Dans ce cas, le modèle de Hill ainsi a été rapporté à celui de Michaelis-Menten. Cette approximation pourrait se justifier par le profil hyperbolique de la courbe, typique du modèle de Michaelis-menten et différent de celui sigmoïdal caractérisant les courbes du modèle de Hill. Les impuretés contenues dans la préparation commerciale de la pectine ne décriraient pas des phénomènes pouvant permettre l'apparition de la cinétique non-michaelienne. Les utilisations du modèle de Michaelis-Menten dans les études de dépectinisation de cette pectine d'agrumes pourraient donc être justifiées. L'unicité de n représente en effet l'unicité du site actif ou site d'hydrolyse des substrats avec libération de monomères. Car en effet, sept (07) isoformes de polygalacturonases peuvent être isolées à partir de la moisissure *Aspergillus niger*. A l'exception de l'isoforme PGD qui possède quatre (04) sites de fixation du substrat, les autres en possèdent au moins sept (07) (Benen *et al.*, 2003). Deux types de sites peuvent être rencontrés

au niveau de la structure des PG : les sites négatifs et positifs. Les sites positifs sont ceux qui doivent être occupés par les unités de l'acide galacturonique du substrat à partir de son extrémité réductrice pour que le complexe formé soit productif. Selon le type de produit pouvant être issu de l'hydrolyse, les unités de l'acide galacturonique à partir de cette extrémité doivent occuper ces sites positifs. Quel que soit le degré de polymérisation du produit, la réaction d'hydrolyse se déroule exclusivement à l'arrangement tridimensionnel situé entre les sites de fixation - 1 et +1. Cet espace tridimensionnel est constitué des acides aminés impliqués dans l'hydrolyse de la liaison galactosidique (Figure 7) ; celui-ci constitue par conséquent le site actif de l'enzyme (Van Pouderoyen *et al.* 2003). Le produit de la réaction mesuré dans cette étude est le monomère de l'acide galacturonique. L'hydrolyse permettant la libération de ce dernier se déroulerait lorsque l'unité terminale de l'acide galacturonique du substrat à partir de son extrémité réductrice occupe le premier site positif (site +1) de la molécule d'enzyme (quelle que soit l'isoforme de PG) (Figure 19) (Pařenicová *et al.*, 1998; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000; Pařenicová *et al.*, 2000).

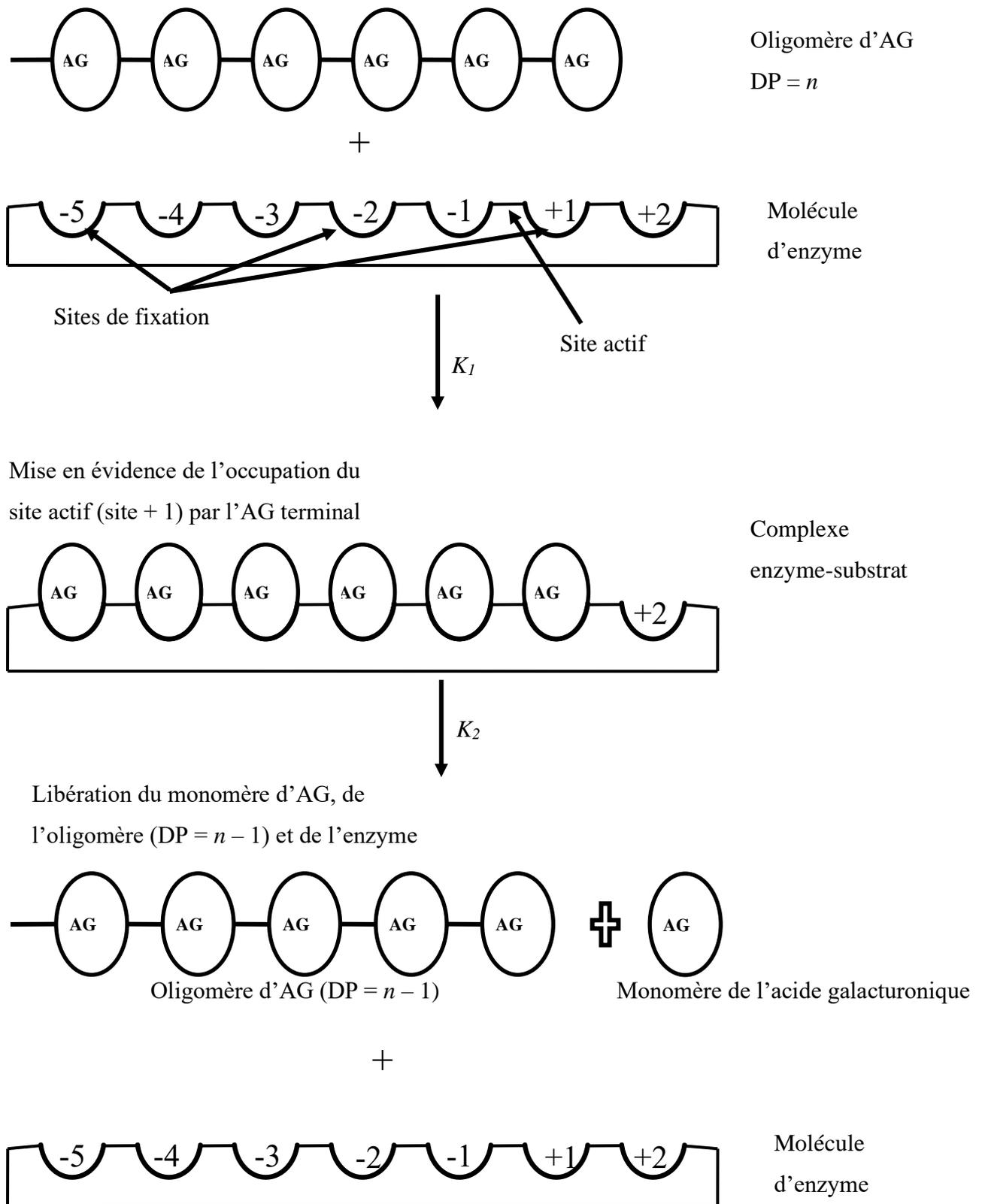


Figure 19 : Mécanisme réactionnel de libération d'une unité de l'acide galacturonique

L'assimilation du modèle de Hill à celui de Michaelis-Menten a permis d'estimer les paramètres catalytiques de la préparation enzymatique. A partir de l'Equation 14, la valeur **0,017 $\mu\text{mol/mL/min}$** représenterait la vitesse maximale (V_{max}). A cause de l'unicité de n , la constante **1148,50^{1,09} mg/L** devient égale à **1148,50 mg/L** qui représenterait la constante de Michaelis-Menten (K_M) du mélange de pectinases. Le paramètre K_M représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est la moitié de la vitesse maximale. Cette valeur renseignerait sur l'affinité du consortium d'enzymes pectolytiques par rapport à la pectine commerciale. Les préparations commerciales de pectinases seraient un mélange de toutes les isoformes de PG (Nikolić et Mojovic, 2007). Chaque isoforme a une valeur spécifique de K_M variant de moins de 150 mg/L pour les isoformes PGI, PGII, PGA et PGC à 2500 mg/L pour l'isoforme PGE (Benen *et al.*, 2003).

Les deux plages de concentrations en pectine ci-dessus mentionnées (0 – 1700 mg/L et 1700 – 1900 mg/L) peuvent être décrites par deux types différents de cinétique. Dans la première région où l'augmentation de la concentration en pectine entraîne une augmentation de la vitesse de la réaction, la cinétique serait de premier ordre. La vitesse de la réaction serait directement proportionnelle à la concentration en substrat, la corrélation étant de type linéaire. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que pour des concentrations en pectine comprises entre 0 et 1700 mg/L, les enzymes hydrolyseraient les molécules de substrats avec formation de produits. L'augmentation de la concentration en substrat conduirait à une augmentation de la concentration en produits formés pendant la durée de réaction. L'accumulation de monomères de l'acide galacturonique n'affecterait pas la réaction enzymatique comme l'ont montré la courbe d'évolution des produits des différentes isoformes de PG (Pařenicová *et al.*, 1998; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000; Pařenicová *et al.*, 2000). Dans la deuxième région (concentration en pectine comprise entre

1700 et 1900 mg/L) où la vitesse de la réaction est pratiquement constante autour d'une valeur de 0,01 $\mu\text{mol/mL/min}$, la cinétique serait de zéro ordre. Dans cette région, la vitesse de la réaction ne serait pas fonction de la concentration en substrat ; par conséquent l'augmentation de la concentration en pectine n'affecterait pas la vitesse de la réaction. Ceci pourrait être dû au fait qu'au-delà 1700 mg/L, le milieu réactionnel deviendrait saturé en substrat entraînant une augmentation de la viscosité du milieu réactionnel et limitant les phénomènes de diffusion des enzymes vers leurs substrats. Il en résulterait une variation négligeable de la vitesse de la réaction (Marangoni, 2003 ; Bisswanger, 2008).

2.3.2 Modélisation de la cinétique de dégradation enzymatique de la pectine du jus de goyave

Le taux d'hydrolyse varie en général entre 0 et 58% pour la concentration en enzyme de 0,033% m/m pour un temps de contact enzyme-purée compris entre 0 et 90 min, tandis qu'il varie entre 0 et 82% pour les autres concentrations (Figure 20). Pour chaque concentration en enzyme, le taux d'hydrolyse augmente avec une augmentation du temps de contact enzyme-purée. Cette augmentation du taux d'hydrolyse se fait avec une diminution progressive de la pente de la droite entre deux périodes de temps distantes de 20 minutes. Dans le cas des concentrations en enzyme 0,055 et 0,078% m/m, le taux d'hydrolyse augmente considérablement entre 0 et 20 minutes. Cette période est suivie des périodes de faible croissance (pente de la droite sensiblement égale à 0). Dans le cas de la concentration en enzyme 0,100% m/m, le taux d'hydrolyse augmente considérablement dans les trois premières minutes de contact entre l'enzyme et le substrat.

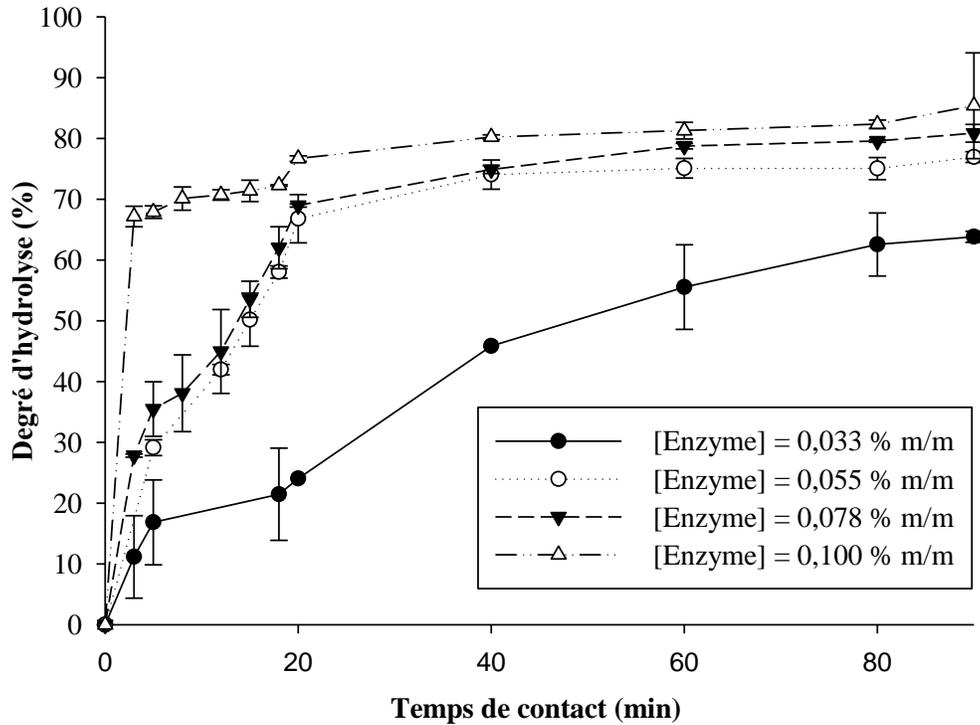


Figure 20: Effet du temps de contact enzyme-substrat et de la concentration d'enzyme sur le taux d'hydrolyse

L'augmentation du taux d'hydrolyse serait due à une diminution de la quantité de pectine suite à leur hydrolyse au cours du temps (Nso *et al.*, 1998 ; Tapre et Jain, 2014). Cette hydrolyse s'accompagnerait de la formation progressive des produits de la réaction. Entre 0 et 20 minutes, l'hydrolyse de la pectine se produirait à une vitesse de réaction d'hydrolyse élevée (augmentation de 65% du taux d'hydrolyse) (Combo *et al.*, 2012). L'augmentation du taux d'hydrolyse entre 20 et 90 minutes pourrait s'expliquer par l'accumulation progressive des produits de la réaction dans le jus de goyave à chair blanche qui satureraient ce dernier (Combo *et al.*, 2012). Il pourrait également se produire un phénomène d'inhibition des enzymes par les produits de la réaction (Benen *et al.*, 2003). Couplée à la diminution de la quantité de substrat, cette saturation entraînerait une faible augmentation du taux d'hydrolyse (65% à 75%). Dans cet intervalle de temps, il se produirait des phénomènes d'attaque simple et/ou de processivité conduisant à l'hydrolyse des

substrats secondaires (oligomères de faible poids moléculaire issus de l'hydrolyse de la pectine initiale) (Nikolić et Mojovic, 2007). Dans le cas de 0,100% m/m d'enzyme, ces phénomènes pourraient être observés dès la troisième minute de réaction traduisant une hydrolyse de la pectine avec accumulation de produits dès les premières minutes de la réaction comme rapportée par Combo et al. (2012).

2.3.2.1 Modélisation de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la pectine de goyave

La détermination de la concentration en pectine après chaque temps de réaction et pour chaque concentration en enzyme a permis de déterminer la valeur de la vitesse de réaction. Ces vitesses de réaction ont été tracées en fonction de la concentration en substrat. Les courbes de vitesse de réaction en fonction de la concentration en pectine ont été ajustées en utilisant l'Equation B de Hill qui est celle la plus facile et la mieux adaptée à cet effet, car elle ne nécessite que l'estimation de deux paramètres. Cette Equation B se distingue de celles A et C (également décrites par Hill (1910)) qui nécessitent l'estimation de $(2n + 1)$ paramètres (Goutelle *et al.*, 2008). Le choix de l'Equation B de Hill se justifie également par son application dans plusieurs procédés biochimiques, physiologiques, pharmacologiques pour analyser les équilibres de liaisons dans les interactions ligand – récepteur. Elle présente néanmoins l'inconvénient d'être basée sur la fixation simultanée de plusieurs molécules de ligand sur le récepteur et ne tient pas compte des complexes intermédiaires qui peuvent se former de manière séquentielle ou indépendante (Weiss, 1997). A l'aide de cette équation, différents modèles ont été générés pour chaque concentration en enzyme à l'aide du logiciel Matlab 14b (Tableau 3). Les coefficients de modèles ont été estimés en minimisant la somme des carrés à chaque point expérimental.

Tableau 3: Modèles de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la pectine dans le jus de goyave à chair blanche générés pour chaque concentration en enzyme

Concentration en enzyme	0,033 % m/m	0,055 % m/m	0,078 % m/m	0,100 % m/m
Equation de modèle (V)	$60 \times \frac{[S]^7}{K + [S]^7}$	$145 \times \frac{[S]^6}{K + [S]^6}$	$230 \times \frac{[S]^5}{K + [S]^5}$	$280 \times \frac{[S]^4}{K + [S]^4}$
V_{max}	60	145	230	280
n	7	6	5	4

Les différents modèles (ligne continue) ont permis d'ajuster les points expérimentaux représentés par des puces (Figure 21).

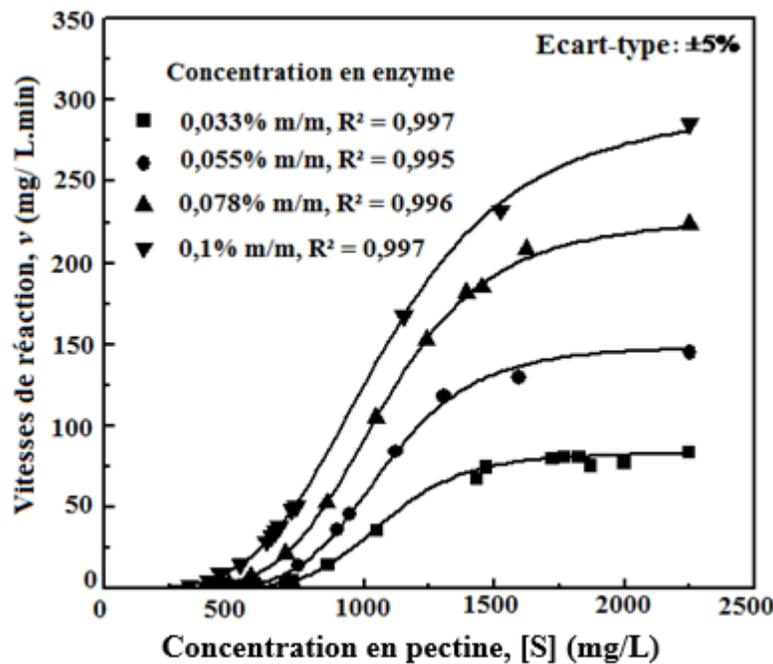


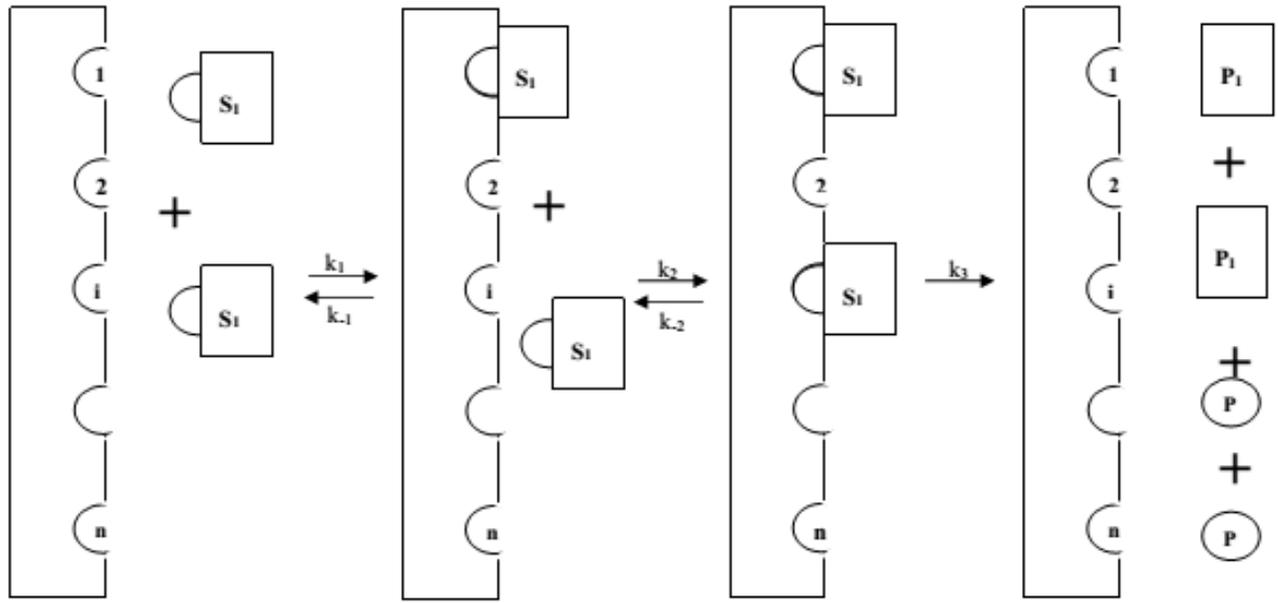
Figure 21: Modélisation de la cinétique réactionnelle décrite par les pectinases pour différentes concentrations en enzyme (Les lignes représentent les modèles obtenus à l'aide de l'Equation de Hill).

La concentration en pectine de l'échantillon non traité est de 2300 mg/L (Figure 21). La diminution de la concentration en substrat pour chaque concentration en enzyme utilisée entraîne une diminution de la vitesse de réaction. L'hydrolyse de la pectine au cours de la réaction entraînerait la diminution de leur concentration au cours du temps (Nso *et al.*, 1998 ; Tapre et Jain, 2014). Cette hydrolyse serait initiée dès les premières minutes de réaction avec accumulation des produits (Combo *et al.*, 2012). Les taux d'hydrolyse supérieurs à 35% obtenus dès les premières minutes de réaction pourraient justifier les valeurs élevées de vitesse de la réaction pour des concentrations en pectine de l'ordre de 2000 à 2300 mg/L et une diminution rapide de la vitesse de la réaction pour des concentrations en substrats comprises entre 1000 et 2000 mg/L. Avec une augmentation de la concentration en enzyme, l'effet de cette diminution deviendrait de plus en plus considérable, étant donné que la vitesse de la réaction enzymatique est fonction de la concentration en enzyme (Robinson, 2015). La concentration en pectine après 3 minutes de réaction est de l'ordre de 800 mg/L avec 0,100% m/m d'enzyme alors qu'elle est d'environ 1900 mg/L avec 0,033% m/m d'enzyme.

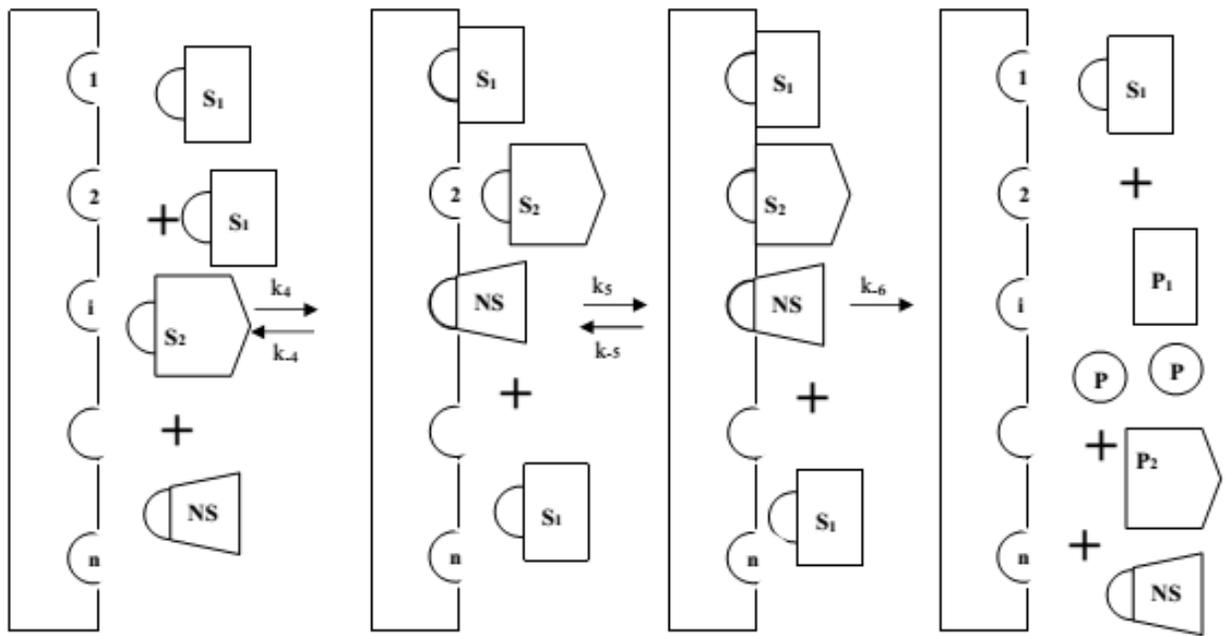
Les cinétiques de dégradation de la pectine de goyave à chair blanche décrivent toutes un profil sigmoïdal avec une double concavité ; une concavité croissante vers le haut pour des valeurs de concentrations en pectine comprise entre 300 et 800 mg/L, et une concavité décroissante vers le haut pour des valeurs de concentration en pectine comprises entre 1500 et 2000 mg/L. La double concavité traduirait l'existence d'un point d'inflexion pour toutes les courbes ; l'existence du point d'inflexion pouvant s'expliquer par la valeur de n supérieure à 1 pour toutes les concentrations en enzyme (Goutelle *et al.*, 2008). Les différentes courbes présentent une sigmoïdité croissante avec l'augmentation de la concentration en enzyme pouvant ainsi expliquer la raideur croissante des courbes avec l'augmentation de la concentration en enzyme. De plus, pour chaque courbe,

l'amplitude des intervalles de concentrations en pectine où la concavité décroissante se manifeste augmente avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Ces intervalles sont 1100 – 1700 mg/L, 1100 – 1800 mg/L, 1200 – 2200 mg/L et 1200 – 2300 mg/L pour des concentrations en enzyme de 0,033%, 0,055%, 0,078% et 0,100% m/m, respectivement. Dans le cas des intervalles de manifestation de la concavité croissante, leur amplitude diminue avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Elles sont de 300 – 850 mg/L, 300 – 800 mg/L, 300 – 700 mg/L et 300 – 600 mg/L pour les concentrations en enzyme de 0,033%, 0,055%, 0,078% et 0,100% m/m, respectivement.

La tendance sigmoïdale observée avec la pectine de goyave à chair blanche pourrait être expliquée par les phénomènes de coopérativité et d'allotérisme (Figure 22). La coopérativité (Figure 22a) pourrait être expliquée par le fait que la fixation d'une molécule de substrat sur la molécule d'enzyme y entraînerait des modifications conformationnelles et/ou électroniques. Ceci pourrait résulter en une amélioration (coopérativité positive) ou une détérioration (coopérativité négative) de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis d'une autre molécule de substrat (Marangoni, 2003). La valeur de n supérieure à l'unité telle qu'observée avec les différentes courbes de la Figure 18 traduirait le fait qu'il s'agit d'une coopérativité positive (Goutelle *et al.*, 2008). L'allotérisme (Figure 22b) est le phénomène qui est observé lorsque la fixation d'une molécule de substrat ou d'un ligand affecte l'activité de l'enzyme. Le ligand pourrait être un inhibiteur ou un effecteur. L'allotérisme homotropique est celui où la régulation de l'activité est essentiellement assurée par la molécule de substrat ou par une molécule de même type. L'allotérisme est dit hétérotropique dans le cas d'un ligand qui n'est pas le substrat ou une combinaison du substrat et du non-substrat (parfois produit de la réaction) (Marangoni, 2003).



(a)



(b)

Figure 22: Représentation schématique du mécanisme de la cinétique de Hill. (a) le mécanisme de la coopérativité et (b) le mécanisme d'allostérisme. S : Substrat, P : Produit, NS : Non Substrat

L'allostérisme pourrait être expliqué par le phénomène d'inhibition inhérent aux molécules intrinsèques de la goyave. Deo et Shastri (2003) ont isolé trois isoformes de protéines inhibitrices de polygalacturonase à partir du cultivar Lucknown 49 de la goyave. Ces protéines qui sont des glycoprotéines, participent à un mécanisme de défense de la goyave à chair blanche contre les attaques fongiques. Elles décrivent toutes une inhibition mixte vis – à – vis des polygalacturonases d'*A. niger*. Les isoformes PGIP II et PGIP III auraient une affinité élevée pour les polygalacturonases d'*A. niger* que l'isoforme PGIP I. L'affinité élevée de ces protéines vis-à-vis des enzymes aurait pour conséquence la diminution de leur affinité vis – à – vis de leurs substrats. De plus, ces chercheurs ont prouvé que c'est durant la phase initiale de mûrissement (couleur de la peau du fruit passant du vert pâle au jaune verdâtre) que l'activité de ces protéines est la plus élevée. Parmi les molécules intrinsèques à la goyave, figureraient les sucres réducteurs issus de l'hydrolyse de la pectine par les pectinases au cours du mûrissement (Jain *et al.*, 2001). Ceux-ci provoquent également un phénomène d'inhibition des polygalacturonases d'*A. niger* tel que décrit ci-dessous (Section 2.3.2.2).

Le phénomène d'allotérisme pourrait également être la conséquence de la présence de plusieurs sites de fixation du substrat ou du ligand sur la molécule d'enzyme. *Aspergillus niger*, qui est la source de la préparation enzymatique utilisée dans cette étude, est une moisissure filamenteuse saprophyte pouvant synthétiser une large variété d'enzymes capables d'hydrolyser la pectine. Parmi ces enzymes, se trouvent les polygalacturonases. Benen *et al.* (2003) ont rapporté l'existence de 7 isoformes de polygalacturonases issues d'*A. niger* : les isoformes PGI, PGII, PGA, PGB, PGC, PGD et PGE. L'allostérisme ou la coopérativité des polygalacturonases d'*A niger* pourrait être expliqué par la présence de plusieurs sites de fixation des substrats sur les différentes isoformes d'enzymes. Il a été rapporté qu'à l'exception de l'isoforme PGD qui possède quatre (04)

sites de fixation de substrat (- 3 à +1), toutes les autres possèderaient au moins 7 sites (- 5 à +2) (Benen *et al.*, 2003).

Toutes les isoformes de polygalacturonase d'*Aspergillus niger* appartiennent à la famille des Hydrolases – 28. Elles sont capables d'hydrolyser les liaisons α - (1 – 4) galactosidiques des oligomères de l'acide galacturonique pour libérer des produits de faibles degrés de polymérisation. Elles sont de type endo, c'est-à-dire qu'elles n'hydrolysent pas les chaînes de la pectine à partir de l'extrémité libre non réductrice, mais de façon aléatoire avec libération de produits de degrés de polymérisation variables (Prasanna *et al.*, 2007). Les isoformes de polygalacturonase d'*A. niger* hydrolysent la pectine ou les oligomères d'acides galacturoniques à partir de l'extrémité réductrice. Elles ont des caractéristiques intrinsèques distinctes. Les masses moléculaires sont 58 kDa, 38 kDa, 35 497 Da, 35 188 Da, 61 kDa, 50 788 Da et 35 584 Da pour les isoformes PGI, PGII, PGA, PGB, PGC, PGD et PGE, respectivement (Pařenicová *et al.*, 1998 ; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). Les pH optimums d'activité varient de 3,8 à 5,0. Les paramètres cinétiques des isoformes sont également différents. Les valeurs de K_M sont inférieures à 0,15 mg/mL pour les isoformes PGI, PGII, PGA et PGC ; elles sont de 0,9 mg/mL, 0,2 mg/mL, 2,5 mg/mL pour les isoformes PGB, PGD et PGE, respectivement. Les valeurs de V_{max} sont 800 U/mg, 4000 U/mg, 1200 U/mg, 900 U/mg, 25 U/mg, 96 U/mg et 80 U/mg pour les isoformes PGI, PGII, PGA, PGB, PGC, PGD et PGE, respectivement (Benen *et al.*, 2003). Les isoformes auraient une large gamme de substrats et nécessiteraient un degré de polymérisation minimal pour l'expression de leur activité. Le dimère de l'acide galacturonique est le plus petit pouvant être hydrolysé ; cette hydrolyse ne pouvant être faite que par l'isoforme PGD. Pour les autres isoformes, le plus petit substrat est le trimère de l'acide galacturonique (Pařenicová *et al.*, 2000). Chacune des isoformes

a également un mode d'action spécifique sur la pectine et des affinités différentes pour certains types de substrat (Pařenicová *et al.*, 1998 ; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000).

L'hydrolyse de la pectine et des produits dérivés par les isoformes de PG pourrait se faire soit par le mécanisme de simple attaque (Figure 23a), soit par le mécanisme d'attaque multiple connu sous l'appellation de processivité (Figure 23b). Le premier mécanisme impliquerait l'hydrolyse de la molécule de substrat avec libération des produits. Dans le second mécanisme, après l'hydrolyse, un produit (de préférence celui au plus petit degré de polymérisation) serait libéré tandis que l'autre resterait fixé à l'enzyme, et subirait une réorientation et un déplacement vers le site actif pour une nouvelle réaction d'hydrolyse. Parmi les isoformes de PG, seules PGI, PGA, PGC et PGD sont processives (Benen *et al.*, 2003). Pour chaque isoforme, la manifestation de la processivité nécessiterait un degré de polymérisation minimal précis. Les isoformes PGA et PGC seraient processives à partir de DP 7, tandis que l'isoforme PGD serait processive à partir de DP 4 et l'isoforme PGI à partir de DP 6. Pour des valeurs de degré de polymérisation inférieures à ces valeurs, le mécanisme d'action serait l'attaque simple (Benen, Kester et Visser, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000 ; Pařenicová *et al.*, 2000).

Le mécanisme d'action des isoformes sur les molécules de pectine serait concerté et séquentiel. Au regard des valeurs de K_M des isoformes de PG, celles qui vont hydrolyser les macromolécules de pectine sont les isoformes PGI, PGII, PGA et PGC. Ces macromolécules seraient les substrats naturels de ces isoformes. Les valeurs de K_M des autres isoformes prouveraient que la pectine ne serait pas leur substrat naturel (Benen *et al.*, 2003). Ces dernières isoformes préféreraient les oligomères de faible poids moléculaire. L'isoforme PGII, plus active sur les macromolécules de pectine au regard de sa valeur de V_{max} , les hydrolyserait et libérerait des oligomères des poids moléculaires élevés. Cette isoforme en synergie avec celles PGI, PGA et

PGB hydrolyseraient les oligomères ainsi obtenus et libéreraient des monomères et des oligomères de faible degré de polymérisation (Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). La synergie entre les PGI et PGII (isoformes majeurs) pourrait justifier leur prépondérance dans les préparations enzymatiques industrielles (Benen *et al.*, 1999). Les oligomères de faible degré de polymérisation seraient hydrolysés à la fin par des autres isoformes (dits mineurs). L'isoforme PGD serait celle qui hydrolyse plus facilement les di et trimères (Pařenicová *et al.*, 2000). L'observation des fréquences de scission des liaisons de toutes les isoformes montre que la première liaison galactosidique est celle ayant la fréquence la plus élevée ; cette liaison serait donc la plus hydrolysée avec des fréquences supérieures à 50% pour des degrés de polymérisation compris entre 2 et 8. Cette préférence pour la première liaison expliquerait l'accumulation progressive des monomères observée sur les courbes d'apparition des produits de la réaction observée pour toutes les isoformes. Cette liaison est suivie de la deuxième. L'isoforme PGB est celle qui hydrolyse préférentiellement à partir des deuxième et troisième liaisons (Pařenicová *et al.*, 2000). Ces courbes montrent une accumulation progressive des mono, di et trimères de l'acide galacturonique. Les oligomères de degré de polymérisation supérieur à 3 s'accumuleraient plus lentement et leur teneur diminue par la suite à cause de leur hydrolyse en mono et dimères, selon la nature de l'isoforme. Pour les isoformes non-processives (PGII, PGB et PGE), il apparaît une accumulation des trimères, tétramères et pentamères dès les premières minutes de la réaction. Au cours du temps, il y a donc accumulation des produits de poids moléculaire décroissant (Pařenicová *et al.*, 1998 ; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000 ; Pařenicová *et al.*, 2000).

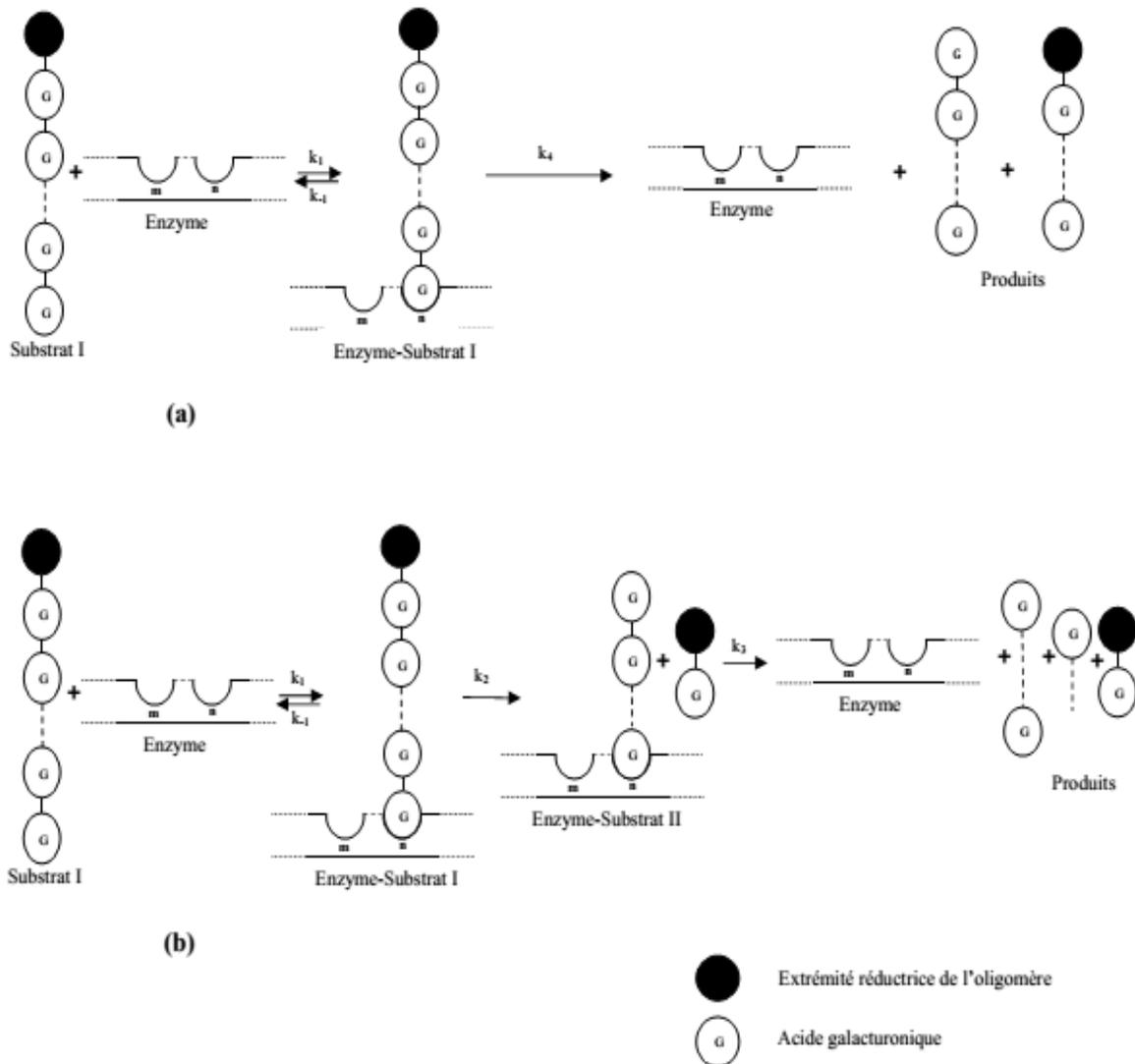


Figure 23: Représentation schématique des mécanismes d'attaque simple (a) et de processivité (b) pouvant avoir lieu sur un sous-site de pectinase d'*A. niger* avec un substrat à extrémité réduite. m et n = sites de fixation du substrat ; k: constantes de vitesse de réaction.

La diminution de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat (Figure 21) pourrait être expliquée par la diminution de la vitesse des réactions d'hydrolyse secondaire des nouveaux substrats (produits de la réaction d'hydrolyse primaire des substrats de degré de polymérisation élevé). Ce phénomène est commun aux hydrolases possédant plusieurs sous-sites de fixation (Pařenicová *et al.*, 2000). La vitesse de la réaction d'hydrolyse d'un oligomère de degré

de polymérisation donné est plus faible que celle de l'oligomère de degré de polymérisation immédiatement supérieur dont il est issu. Quelques exceptions existent ; c'est le cas des pentamères dont l'hydrolyse se fait à une vitesse de réaction inférieure à celle des tetramères dans le cas des isoformes PGI et PGD (Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). De plus, la diminution de la concentration d'un oligomère de poids moléculaire donné du fait de l'hydrolyse s'accompagnerait d'une diminution de la vitesse de la réaction ; ce phénomène est observé chez toutes les isoformes à l'exception de PGD (Pařenicová *et al.*, 1998 ; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000 ; Benen *et al.*, 2003).

2.3.2.2 Effet de la concentration en enzyme sur la valeur du coefficient de

Hill (n)

Pour les concentrations en enzyme allant de 0,033% à 0,100% m/m, la valeur n diminue de 7 à 4 (Figure 24). L'augmentation de la concentration en enzyme entraîne par conséquent une diminution de la valeur de n et donc une diminution du nombre de sites de fixation du substrat. Les valeurs obtenues corroborent avec celles obtenues par Prinz (2010) qui a reporté des valeurs élevées du coefficient de Hill (supérieures à 4) dans l'analyse des courbes de dose-réponses. Cette diminution de la valeur de n avec la concentration en enzyme justifierait le caractère moins prononcé de la sigmoïdité observé sur les courbes de la vitesse en fonction de la concentration en pectine. Ceci pourrait être dû au fait que l'augmentation de la concentration en enzyme entraînerait une augmentation de la quantité de produits. Au regard de ce qui précède, l'action enzymatique s'accompagnerait d'une libération d'une large gamme de produits de poids moléculaire variable. La diminution du nombre de sites de fixation pourrait également être due à deux phénomènes d'inhibition qui pourraient être affectés par l'augmentation de la concentration en enzyme. Le premier phénomène serait celui de l'inhibition causée par certains produits de la

réaction suite à la processivité. Certains substrats auraient une affinité avec certains sites de fixation bien précis. Les hexamères se fixeraient préférentiellement sur les sites allant de -5 à $+1$; l'hydrolyse se produit et une molécule de monomère est libérée. Le pentamère qui en résulte resterait attaché à l'enzyme au niveau des sous-sites -5 à -1 à cause de la forte affinité de cette portion de l'enzyme (-5 à -1). Dans le cas d'une enzyme processive, le nouveau complexe enzyme – pentamère serait non productif et aucune réaction ne pourrait se produire. Le pentamère provoquerait alors une inhibition par le produit et empêcherait la fixation d'une nouvelle molécule d'hexamère (Figure 25c). Pour que la réaction ait lieu, une migration du pentamère à la surface de l'enzyme vers les sous-sites -4 à $+1$ devrait se produire. Ce phénomène serait observé avec les isoformes PGI et PGA (Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). Un phénomène similaire a été constaté avec l'heptamère dans le cas de PGA et PGC. Après l'hydrolyse de l'heptamère au niveau des sous-sites -6 à $+1$, l'hexamère qui en résulte resterait attaché à l'enzyme au niveau des sous-sites -6 à -1 . La fixation d'une nouvelle molécule d'heptamère deviendrait impossible et une migration de l'hexamère vers les sous-sites -5 à $+1$ devrait donc se produire (Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). Le deuxième phénomène serait celui de l'inhibition de l'enzyme par les molécules de substrat (Pařenicová *et al.*, 1998 ; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). Lorsque le pentamère est utilisé comme substrat, il pourrait former avec l'enzyme un complexe productif s'il s'attache aux sous-sites -4 à $+1$ ou -3 à $+2$ (Figure 25a). Il pourrait également former un complexe improductif, s'il s'attache aux sous-sites -5 à -1 à cause de la forte affinité des sous-sites (Figure 25b). Dans le deuxième cas, il apparaît un phénomène d'inhibition par le substrat (Benen *et al.*, 2003). Les fixations improductives des penta et hexamères sur des sites donnés provoqueraient ainsi des interactions allostériques dans la mesure où elles empêcheraient la fixation fonctionnelle d'autres molécules de substrat (Prinz, 2010). L'augmentation de la

concentration en enzyme permettrait d'accélérer et de donner plus d'importance à ces différents phénomènes.

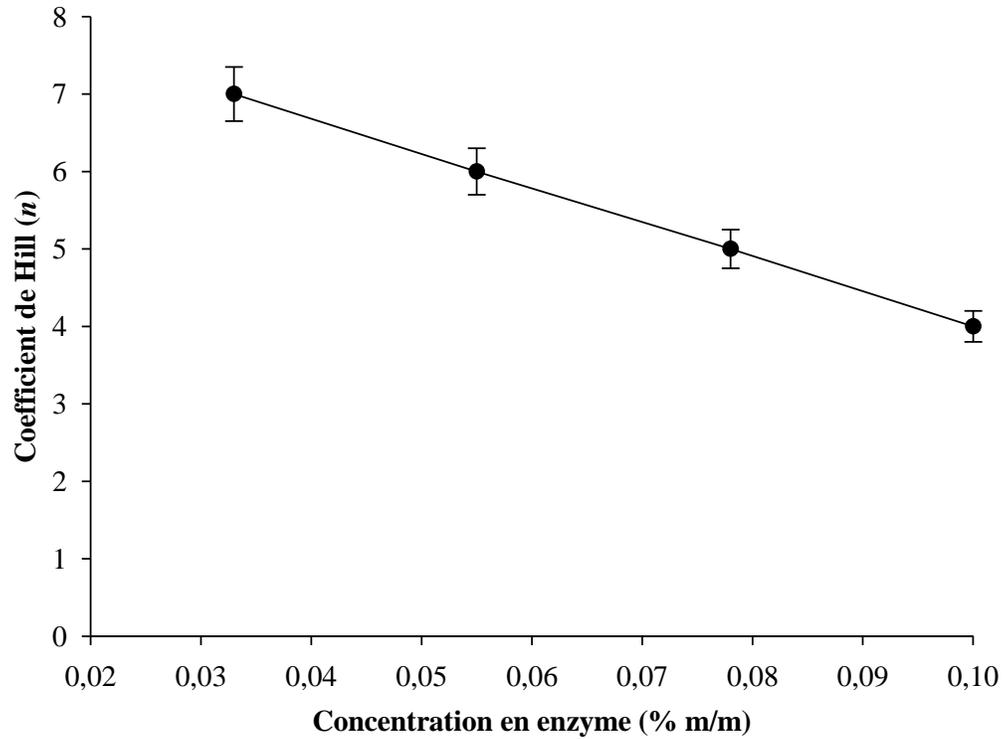


Figure 24: Effet de la concentration en enzyme sur la valeur du coefficient de Hill

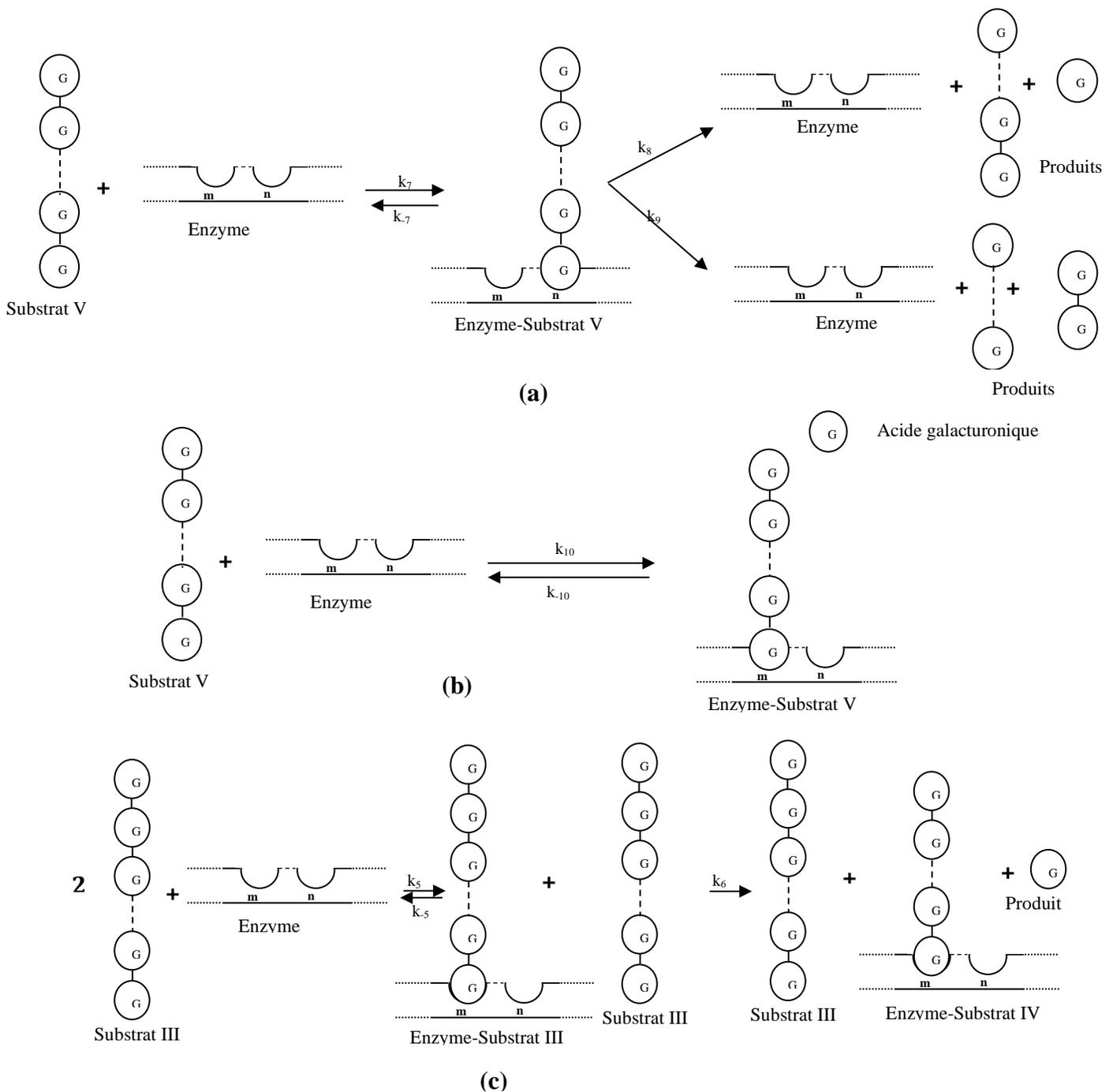


Figure 25: Représentation schématique du phénomène d'affinité des substrats avec les sites de fixation. (a) Formation d'un complexe enzyme – substrat suivie de l'hydrolyse au niveau d'un site donné ; (b) Formation d'un complexe enzyme – substrat inactif sur un autre site de fixation ; (c) Mise en évidence de phénomène d'inhibition de la réaction par le produit de la réaction due à son affinité avec l'enzyme. m et n = sites de fixation du substrat; k : constantes de réaction.

Nikolić et Mojovic (2007) ont rapporté une production graduelle des oligomères de degré de polymérisation décroissant au cours de l'hydrolyse de la pectine de pomme par les polygalacturonases d'*A. niger*. Avec l'augmentation de la durée de réaction, il apparaissait une diminution progressive de la concentration en octamères, heptamères, hexamères et pentamères. Cette diminution progressive de la concentration de ces oligomères traduirait leur disparition due à leur hydrolyse par les polygalacturonases, d'où l'augmentation de la concentration en tétramères, trimères, dimères et monomères (Nikolić et Mojovic, 2007). L'activité de la préparation enzymatique utilisée dans le cas de la présente étude (8000 – 12000 U/g) pourrait entraîner l'accélération du phénomène d'hydrolyse des oligomères décrit par ces deux auteurs qui ont utilisé des enzymes d'activité (1000 U/g). Il se produirait donc l'hydrolyse des oligomères de degré de polymérisation décroissant au cours de la durée de traitement. La diminution du degré de polymérisation des substrats au cours de l'hydrolyse couplée à la diminution de la vitesse de réaction permettrait d'expliquer la diminution du nombre de sites (Figure 24). La vitesse d'hydrolyse d'un oligomère de degré de polymérisation donné est plus élevée que celle de l'oligomère immédiatement précédent de degré de polymérisation plus faible. Par exemple, l'hydrolyse du pentamère par la PGI après migration de celui-ci des sous-sites – 5 à – 1 vers les sous-sites – 4 à +1 se déroule avec une vitesse plus de trois fois inférieure à celle de l'hexamère dont il est issu (Benen *et al.*, 1999). La valeur de la vitesse d'hydrolyse des pentamères diminue comparée à celles des tétra et hexamères dans le cas des isoformes PG I, PGA et PGC. Dans le cas de PGA, l'hydrolyse de l'hexamère se déroule à une vitesse de l'ordre de 91% de celle de l'hydrolyse de l'heptamère dont il est issu. L'hydrolyse du pentamère se fait à une vitesse de l'ordre de 18% de celle de l'hydrolyse de l'hexamère dont il est issu (Pařenicová *et al.*, 2000).

La diminution du nombre de sites de fixation pourrait être due à l'affinité entre les sites de fixation et les oligomères de l'acide galacturonique endogènes à la goyave. Ceux-ci proviendraient de l'hydrolyse des molécules de pectine par les pectinases de la goyave à chair blanche au cours du processus de mûrissement du fruit (Prasanna *et al.*, 2007). De plus, au cours de la phase de mûrissement pendant laquelle la couleur de la peau de la goyave à chair blanche change (cultivar Lucknown 49), l'activité de la polygalacturonase augmente passant de 100 unités/g à 140 unités/g de masse de fruit (Jain *et al.*, 2001). Cette augmentation de l'activité a pour conséquence la diminution de la teneur en pectine au cours de cette phase de mûrissement (Jain *et al.*, 2001, Phani Deepthi et Chandra Sekhar, 2015). La diminution de la teneur en pectine au cours de ladite phase causée par l'augmentation de l'activité de la polygalacturonase aurait pour conséquence l'augmentation de la teneur en sucres réducteurs (de 4% à 5,8% de masse fraîche de fruit) et en sucres totaux (de 4,5% à 6,5% de masse fraîche de fruit) telle qu'observée par Jain *et al.* (2001). Parmi ces sucres figureraient les monomères et oligomères de l'acide galacturonique de faibles degrés de polymérisation issus de l'hydrolyse de la pectine par la polygalacturonase de goyave. Ceux-ci pourraient constituer des inhibiteurs pour les isoformes de polygalacturonase d'*A. niger* ajoutées pour accélérer l'hydrolyse de la pectine de goyave.

2.3.2.3 Effet de la concentration en enzyme sur la valeur de V_{max}

La Figure 26 présente l'évolution de la valeur de V_{max} en fonction de la concentration en enzyme.

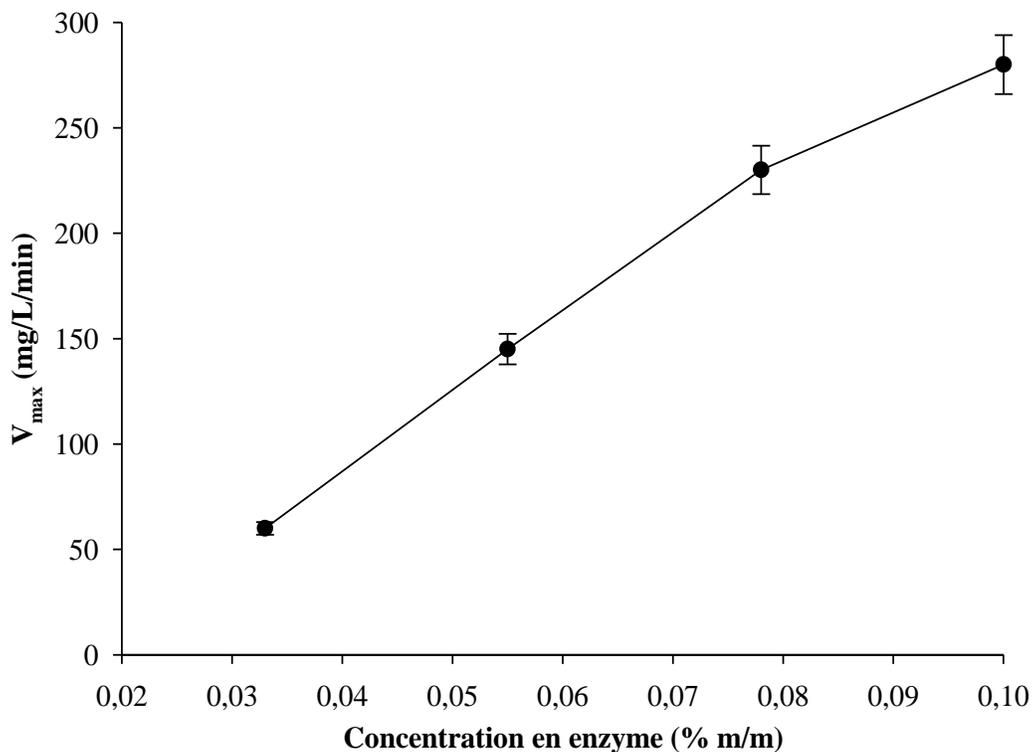


Figure 26: Effet de la concentration en enzyme sur la valeur de V_{max}

Pour la concentration en enzyme allant de 0,033% à 0,100% m/m, V_{max} varie de 60 à 280 mg/L/min (Figure 26). L'augmentation de la concentration en enzyme entraîne donc une augmentation de la valeur de V_{max} . Une relation quasi-linéaire existerait entre la concentration en enzyme et V_{max} . Cette augmentation serait due à l'apparition de plus de produits de la réaction à cause de l'augmentation de la quantité d'enzyme. Nikolić et Mojovic (2007) ont rapporté l'existence d'une relation linéaire entre la quantité de groupements réducteurs libérés par l'hydrolyse de la pectine de pomme par les polygalacturonases d'*A. niger* et la concentration en enzyme pour une durée de traitement de 30 min. Ces quantités de produits rapportées à la durée de traitement permettraient d'obtenir une relation linéaire entre la vitesse de réaction et la concentration en enzyme. La vitesse maximale de réaction est une fonction linéaire de la concentration totale en enzyme (Marangoni, 2003). L'augmentation de la concentration en enzyme

entraînerait une augmentation linéaire de la concentration en produits de la réaction telle que montrée par Nikolić et Mojovic (2007), et par conséquent de la vitesse de la réaction.

2.4 CONCLUSION PARTIELLE

En somme, l'objectif de ce chapitre a été de déterminer le mécanisme de dépectinisation enzymatique de la purée de goyave à chair blanche. Il s'agit de comprendre le comportement cinétique des pectinases d'*Aspergillus niger* sur la pectine commerciale et sur la pectine de goyave. La cinétique de dégradation de la pectine commerciale a été ajustée à l'aide du modèle de Hill. Le coefficient de Hill (n) obtenu a permis de conclure que la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la pectine commerciale obéissait à celle classique de Michaélis-Menten. Les paramètres cinétiques de la préparation enzymatique ont été évalués. Un taux d'hydrolyse de la pectine de goyave à chair blanche supérieur à 80% a été obtenu. La cinétique de cette hydrolyse n'obéissait pas au mécanisme de Michaélis – Menten, mais à celui de Hill pour toutes les concentrations en enzyme. Une diminution du coefficient de Hill a été observée avec la concentration en enzyme ; tandis qu'une tendance contraire a été remarquée pour la vitesse maximale. Le profil sigmoïdal des courbes des cinétiques de dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche a permis de vérifier l'hypothèse formulée dans ce chapitre : l'hydrolyse enzymatique de la pectine de goyave à chair blanche n'obéit pas au mécanisme classique de Michaelis Menten

La dépectinisation enzymatique du jus de goyave à chair blanche s'accompagnant de la désintégration du réseau macromoléculaire de pectine, il serait indispensable de déterminer l'effet de cette désintégration sur les autres caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche et son homogénéité en fonction des différentes conditions opératoires.

CHAPITRE 3

EFFET DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHEMIQUES DU JUS DE GOYAVE A CHAIR BLANCHE

CHAPITRE 3 : EFFET DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DU JUS DE GOYAVE A CHAIR BLANCHE

RESUME DU CHAPITRE

L'objectif de ce chapitre était de déterminer l'effet de la concentration en pectinases et du temps de contact enzyme-purée sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation. Cette détermination s'est faite sur les échantillons du chapitre précédent. Les extraits séchés d'échantillon ont été analysés par le microscope électronique à balayage avec émission de champ. Les résultats obtenus ont montré que le traitement enzymatique a contribué à une diminution considérable de la viscosité du jus dès la troisième minute de réaction pour toutes les concentrations en enzyme ; après ce temps, la viscosité diminuait de façon négligeable. Le traitement enzymatique a contribué à une augmentation remarquable de la teneur en acide galacturonique. Une différence non notable a été observée pour la conductivité électrique, la couleur du jus, le pH, les teneurs en protéines et polyphénols. La dépectinisation n'a pas eu d'effet considérable sur la capacité antioxydante du jus issu de la dépectinisation. Les images obtenues grâce au microscope électronique à balayage avec émission de champ ont permis de mettre en évidence l'augmentation de la proportion de la phase liquide traduisant la liquéfaction se produisant au cours de la dépectinisation. L'homogénéité du jus de goyave à chair blanche s'améliorait avec l'augmentation du temps de contact enzyme-purée et de la concentration en pectinase. Les granulométries de particules diminuaient au cours du traitement et ces particules étaient plus dispersées avec l'augmentation des conditions de dépectinisation.

3.1 INTRODUCTION

Au cours de la transformation de la goyave, la purée subit un traitement enzymatique visant à hydrolyser ses macromolécules en produits de faibles poids moléculaires. La dépectinisation de la purée s'accompagne de la désintégration du réseau macromoléculaire de pectine. Celle-ci entraîne des conséquences diverses sur les caractéristiques physicochimiques du jus. La viscosité du jus de goyave à chair blanche est relativement faible comparée à celle de la purée initiale (Nso *et al.*, 1998 ; Kaur *et al.*, 2011 ; Akewan *et al.*, 2013). La dépectinisation affecte également le pH du jus ainsi que sa teneur en vitamine C, sa limpidité, sa couleur, sa teneur en sucres solubles totaux et en acide ascorbique, son acidité titrable (Nso *et al.*, 1998 ; Kaur *et al.*, 2011 ; Suradjaban *et al.*, 2012 ; Le *et al.*, 2012 ; Akewan et Choonhahirun, 2013). Elle entraîne également une augmentation de la teneur en méthanol, en sucres neutres et en acides uroniques (Marcelin *et al.*, 2017). L'effet de la dépectinisation sur certaines caractéristiques physicochimiques telles que les teneurs en protéines et polyphénols n'a pas été déterminé par ces différents chercheurs. Ces deux familles de composés sont susceptibles, au cours du stockage, d'initier ou d'être impliqués dans des interactions aboutissant à l'apparition des tannins (Siebert, 1999). De plus, la visualisation de la désintégration des agrégats de particules se produisant au cours de la dépectinisation n'a pas également été étudiée. L'objectif de ce chapitre est de déterminer l'effet de la concentration en pectinases et du temps de contact enzyme-purée sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation. L'hypothèse qui soutient ce chapitre est : Les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la depectinisation dépendent de la concentration en pectinases et de temps de contact enzyme-purée.

3.2 MATERIEL ET METHODES

3.2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans ce chapitre a été constitué des échantillons de jus de goyave à chair blanche qui ont été préparés suivant la procédure décrite à la section 2.2.2.3 du chapitre 2 de ce mémoire.

3.2.2 METHODES

3.2.2.1 Analyses des paramètres physicochimiques des échantillons de jus de goyave à chair blanche issus de la dépectinisation

Pour chaque échantillon de jus de goyave issu de la dépectinisation, un certain nombre d'analyses ont été effectués afin de déterminer les paramètres que sont : la viscosité, la concentration en sucres réducteurs, la teneur en polyphénols, la teneur en protéines, la capacité antioxydante. A ces paramètres s'ajoutent le pH, la conductivité, les sucres solubles totaux et la couleur.

3.2.2.1.1 Détermination de la viscosité apparente

La viscosité du jus de goyave à chair blanche a été déterminée à la température ambiante ($30\pm 2^\circ\text{C}$) à l'aide d'un viscosimètre capillaire de type Ostwald (Pisco, Calcutta, Inde) tel que décrit par Jain et De (2016).

La détermination de la viscosité à l'aide du viscosimètre de type Ostwald a pour principe la mesure du temps d'écoulement d'un volume donné de fluide (liquide ou suspension) à travers un tube capillaire de faible diamètre maintenu à température constante. Pour cela, le temps de passage (t_0) entre les traits supérieur et inférieur du tube capillaire du viscosimètre d'un liquide de référence

(eau) a été mesuré. Ceci a permis de déterminer la constante du viscosimètre. Le temps de passage (t_1) du jus de goyave à chair blanche a également été déterminé par la même procédure. Connaissant la viscosité dynamique de l'eau à la température ambiante, la viscosité dynamique du jus de goyave à chair blanche a été déterminée à partir de l'égalité du rapport des temps d'écoulement et des viscosités apparentes (Equation 15).

$$\mu_{jus} (mPa.s) = \frac{t_1}{t_0} \times \mu_{eau}$$

Équation 15

Avec μ_{jus} et μ_{eau} les viscosités apparentes du jus de goyave à chair blanche et de l'eau en mPa.s, respectivement.

Pour déterminer l'effet des paramètres de traitement sur la viscosité apparente du jus de goyave, la valeur de la viscosité a été tracée en fonction du temps et de la concentration en enzyme.

3.2.2.1.2 Détermination du pH, de la conductivité électrique et des sucres solubles totaux

Le pH et la conductivité ont été mesurés à l'aide d'un multimètre (pHmètre/conductimètre) de poche (Eutech Instruments Ltd, Singapour) à la température ambiante ($30 \pm 2^\circ\text{C}$). L'eau déminéralisée (obtenue du dispositif d'osmose inverse Millipore, Surepro Prefiltration System, Merck Life Science Private Limited, Bangalore, Inde) a été, de ce fait, utilisée comme blanc. L'étalonnage de l'appareil a nécessité une étape préliminaire de lavage des électrodes avec de l'eau déminéralisée. Ensuite, dans un bécher contenant de l'eau déminéralisée, les électrodes ont été immergées. Le pH et la conductivité électrique des échantillons de jus de goyave à chair blanche ont été mesurés en immergeant les électrodes dans le bécher contenant celui-ci. Après cette détermination, les électrodes ont été rincées avec de l'eau déminéralisée.

La teneur en sucres solubles totaux (TSS) a été déterminée par un réfractomètre de laboratoire à affichage numérique (Lab Digital Refractometer Salinity – 300034, Sper Scientific, Scottsdale, Arizona, Etats-Unis d'Amérique). L'eau déminéralisée a été de ce fait utilisée comme blanc. Pour cela, quelques gouttelettes d'eau ont été déposées sur l'interface de lecture. La détermination de la valeur de TSS a été faite en appuyant sur la touche « Read » et la valeur du TSS a été affichée sur l'écran. L'interface de lecture a été nettoyée à l'aide du papier hygiénique pour éliminer toute trace d'eau pouvant influencer la lecture. Quelques gouttelettes de jus de goyave à chair blanche ont été également déposées sur l'interface de lecture et la valeur de TSS mesurée comme dans le cas de l'eau déminéralisée. Après la lecture, l'interface a été nettoyée à l'aide de l'eau déminéralisée et séchée à l'aide du papier hygiénique.

3.2.2.1.3 Détermination de la couleur

La couleur du jus de goyave à chair blanche a été déterminée par la méthode spectrophotométrique par la lecture de l'absorbance à 420nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (M/s Perkin Elmer, Connecticut, USA) telle que décrite par Jain et De (2016). Pour cela, chaque échantillon a été dilué au dixième avec de l'eau déminéralisée dans des tubes à essais de 25mL. La valeur de la couleur de l'échantillon a été obtenue en multipliant la valeur de l'absorbance par 10. L'eau déminéralisée a été utilisée comme blanc.

3.2.2.1.4 Détermination de la teneur en protéines

Cette détermination s'est faite par la méthode de Lowry et al. (1951) avec quelques modifications.

a. Principe

La méthode de Lowry est une procédure qui se déroule en deux étapes : initialement la réaction de Biuret implique la réduction du cuivre (Cu^{2+} en Cu^+) par les protéines dans des solutions alcalines suivie de la réduction du réactif Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate) produisant une couleur bleue caractéristique avec une absorbance maximale à 700nm. Le développement de la couleur est dû non seulement au complexe cuivre-amide, mais également à la tyrosine, au tryptophane et à une faible amplitude aux résidus de cystine, de cystéine et d'histidine. Le protocole utilisé dans le cadre de ce travail a été celui développé par Noble et Bailey (2009) avec quelques modifications.

b. Mode opératoire

Une solution de bicarbonate de sodium (Solution A de Lowry) a été obtenue en dissolvant 1 g de Na_2CO_3 (carbonate de sodium anhydre) (Merck Specialities Private Limited, Mumbai, Inde) dans 50 mL d'une solution de soude 0,1N. La solution B de Lowry a été obtenue en dissolvant dans 5 mL d'eau un mélange de 25 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfate de cuivre pentahydraté) (Merck Specialities Private Limited, Mumbai, Inde) et 50 mg de tartrate de potassium sodium (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, Inde). Les deux solutions ont été par la suite mélangées progressivement pour obtenir la solution de Lowry et cette préparation devait se faire de façon journalière.

Le réactif de Folin-Ciocalteu commercial (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, Inde) a été dilué de moitié (1/2) avec de l'eau déminéralisée juste avant utilisation.

La gamme d'étalonnage a été obtenue ainsi qu'il suit. A partir d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Inde) étalon mère à 2,5 g/L,

une solution étalon fille a été préparée pour réaliser une gamme allant de 0 à 250 µg de protéines. Chaque tube a été complété à 1 mL avec de l'eau distillée. Un volume (5 mL) du réactif de Lowry a été ajouté par la suite dans chaque tube. Après agitation, le mélange a été laissé au repos pendant 10 minutes. Un volume (0,5 mL) de solution de Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu commercial mélangé à de l'eau déminéralisée à un ratio de 1 : 1 v/v) a été ensuite ajouté et l'ensemble a été homogénéisé, puis laissé au repos pendant 30 min dans l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 660 nm contre le blanc préparé en remplaçant 1 mL d'échantillon par 1 mL d'eau déminéralisée.

La quantité de protéine du jus de goyave à chair blanche a été déterminée suivant le protocole précédent à la seule différence que 1 mL d'échantillon a été introduit dans le tube à la place de la solution de BSA. La suite du protocole a été identique à celui développé précédemment.

c. Expression des résultats

La quantité de protéines à chaque prise d'essai a été déterminée en se référant à l'équation de la droite d'étalonnage du BSA à partir de l'Equation 16 :

$$[protéines](mg.l^{-1}) = \frac{Abs}{\alpha} \quad \text{Équation 16}$$

Avec : $[Protéines]$: la concentration en protéine ; Abs : l'absorbance de l'échantillon ; α : la pente de la courbe d'étalonnage.

3.2.2.1.5 Détermination de la teneur en acide galacturonique

Le principe de la méthode de détermination de la teneur en acide galacturonique a été décrit à la Section 2.2.2.1. Cette méthode est celle au cyanoacétamide. Un volume (2 mL) du surnageant provenant de la centrifugation du mélange échantillon-éthanol (Section 2.2.2.5) ont été dilués au

cinquantième dans une fiole jaugée. Un volume (2 mL) de cette dilution a été prélevé pour la détermination de la teneur en acide galacturonique suivant le protocole décrit à la Section 2.2.2.1.

La teneur en acide galacturonique a été déterminée par l'Equation 17 :

$$[AcG](mg.l^{-1}) = \frac{Abs}{\alpha} \times 50 \quad \text{Équation 17}$$

Avec : $[AcG]$: la concentration en acide galacturonique ; Abs : l'absorbance de l'échantillon ; α : la pente de la courbe d'étalonnage.

3.2.2.1.6 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

a. Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

b. Mode opératoire

Le protocole utilisé pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux est celui décrit par Sagu et al. (2014). Un volume (0,5 mL) de jus de goyave à chair blanche ou de blanc ou d'étalon a été introduit dans des tubes de 25 mL et complété avec 0,5 mL de réactif de Folin Ciocalteu commercial de qualité analytique. Le mélange a été incubé pendant 5 min pour faciliter la réaction sous agitation. Un volume (10 mL) d'une solution de carbonate de sodium anhydre (75 g/L) a été ajouté et mélangé. Le contenu du tube a été complété à 25 mL à l'aide de l'eau

déminéralisée. Après mélange, les tubes ont été laissés au repos à la température ambiante (30±2 °C) pendant 1h. L'absorbance a été mesurée à 750 nm à l'aide du spectrophotomètre UV – Visible. L'acide gallique (Sigma Aldrich, Slovaquie) a été utilisé pour la courbe d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique pour 100 mL. Le facteur de dilution a été de 50.

c. Expression des résultats

La teneur en composés phénoliques a été déterminée par l'Equation 18 :

$$[\textit{polyphénols}](\textit{mgGAE}.100\textit{ml}^{-1}) = \frac{\textit{Abs}}{\kappa} \times 50 \quad \text{Equation 18}$$

Avec : *[polyphénols]* : la concentration en composés phénoliques ; *Abs* : l'absorbance de l'échantillon ; κ : la pente de la courbe d'étalonnage.

3.2.2.1.7 Détermination de la capacité antioxydante

a. Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyle) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, c'est-à-dire le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation entraîne également l'apparition de la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue (avec apparition d'une couleur jaune), due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515 – 518 nm (Popovici, Saykova et Tytkowski ; 2009). La Figure 27 présente la structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle)•.

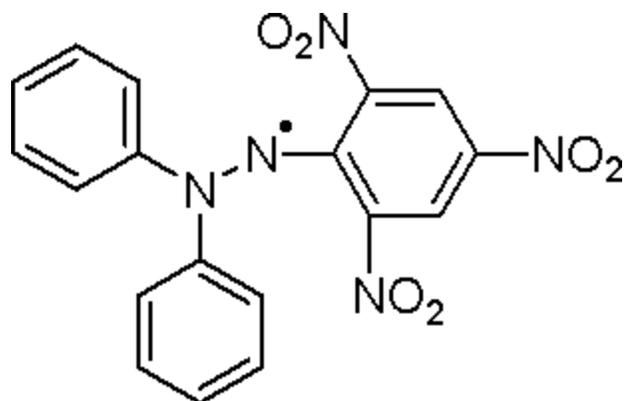
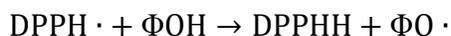
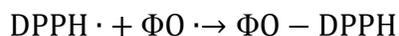
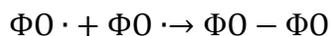


Figure 27: Structure chimique du radical libre DPPH• (Nithya et Madhavi, 20017)

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes : (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques) ; (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivés glycosylés et des anthocyanes). Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH.



Plusieurs voies réactionnelles qui contribuent à la formation des structures plus ou moins stables sont alors possibles :



La capacité antioxydante (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction,

notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier.

b. Mode opératoire

Le protocole de détermination de la capacité antioxydante de chaque échantillon a été celui décrit par Brand-Williams et al. (1995) moyennant quelques modifications. Le milieu réactionnel a été constitué de 2,5 mL de surnageant provenant de la centrifugation du mélange échantillon-éthanol (99% v/v) (Chapitre 2, Section 2.2.2.5), 4,5 mL d'alcool absolu et 0,6 mL de solution de DPPH (0,5mM dans de l'éthanol pur) (Sigma Aldrich, Slovaquie). Lorsque le DPPH réagit avec des composés antioxydants qui peuvent donner l'hydrogène, il est réduit. Ce changement de couleur (du violet sombre au jaune clair) a été caractérisé par l'absorbance à 517nm après 100 min de réaction. Le blanc a été constitué de 2,5 mL de surnageant et 5,1 mL d'éthanol pur. La solution de contrôle a été préparée par un mélange de 7 mL d'éthanol et de 0,6 mL de solution de DPPH. Le pourcentage d'activité antioxydante (CA) a été déterminé par la l'Equation 19 :

$$CA(\%) = 100 - \left[\frac{(Abs_{éch} - Abs_{blanc})}{Abs_{contrôle}} \times 100 \right] \quad \text{Équation 19}$$

CA : Capacité antioxydante de l'échantillon ; $Abs_{éch}$, Abs_{blanc} et $Abs_{contrôle}$: l'absorbance de l'échantillon, du blanc et de la solution de contrôle, respectivement.

L'analyse des variances sur les résultats a été faite grâce au logiciel Statgraphics Centurion version XV.II et le seuil de signification de 5% a été utilisé pour déterminer les niveaux de différence entre les différents échantillons.

3.2.2.1.8 Optimisation des paramètres de traitement enzymatique

L'optimisation des paramètres de dépectinisation a permis de connaître la combinaison des facteurs (temps de contact enzyme-purée et concentration en enzyme) permettant de remplir les conditions du cahier de charges. Ces conditions sont celles obtenues des travaux de la bibliographie sur la goyave à chair blanche blanche couplées à une comparaison des caractéristiques physicochimiques pour toutes les conditions opératoires de dépectinisation. Les travaux d'Ahmed et al. (2014) ont montré que le traitement enzymatique entraînait une diminution du pH d'une amplitude de 0,24 et 0,29 au bout de 90 min de traitement pour 0,05% m/m et 0,10% m/m, respectivement. Ils ont rapporté que la diminution du pH contribuerait à une amélioration de la qualité du jus de goyave. Cette amplitude a été exploitée dans cette étude. Ainsi, la plage de pH retenue dans le cahier de charges est 3,41 – 3,46.

Nso et al. (1998) ont rapporté une réduction de la viscosité de l'ordre de 91% pour une concentration en enzyme de 1024 unités PG/mL pour le cultivar de goyave à chair blanche. Ce taux de réduction de la viscosité a été retenu comme taux minimal de réduction de la viscosité.

Marcelin et al. (2017) dans le cas de la dépectinisation enzymatique du cultivar Sûpreme ont mis en évidence un taux d'hydrolyse maximal de la pectine de 77,7%. Ce taux a été défini comme taux minimal d'hydrolyse de la pectine. Ce paramètre est déterminant pour la dépectinisation, étant donné qu'il renseigne sur la quantité de pectine résiduelle à l'issue d'un traitement enzymatique sous des conditions précises. De plus, l'hydrolyse de la pectine affecterait la variation des autres paramètres. C'est ainsi que la teneur en acide galacturonique la plus élevée possible a été retenue comme critère du cahier de charges.

Le Tableau 4 présente le cahier de charges des réponses ou caractéristiques physicochimiques obtenues à partir de la bibliographie.

Tableau 4 : Cahier de charges des réponses ou paramètres physicochimiques

Paramètres physicochimiques	Etendue
Taux d'hydrolyse (%)	77,7 – 100
pH	3,41 – 3,46
Pourcentage de réduction de Viscosité (%)	91 – 100
Teneur en acide galacturonique	La plus élevée possible

Le cahier de charges a permis de trouver la combinaison de facteurs remplissant les différents critères pour la température de réaction (43 ± 2 °C). Cette combinaison de facteurs tient compte de l'analyse statistique et des seuils de variation entre les différentes valeurs de paramètres.

3.2.2.2 Etude morphologique des échantillons de jus de goyave à chair blanche par la Microscopie Electronique à Balayage avec Emission de Champ

La technique d'imagerie a permis de visualiser la structure des suspensions à travers l'étude de la morphologie des particules, du profil du mélange et de la répartition des granules et particules. L'analyse de l'image a nécessité que le jus de goyave à chair blanche dépectinisé ou non soit déshydraté. Pour cela, les échantillons de jus de goyave à chair blanche ont préalablement été étalés sur des lamelles de microscope et séchés sous vide dans un dessiccateur pendant 10 jours. Les images ont été obtenues par le Microscope électronique à balayage avec émission de champ (Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)) (JEOL, modèle JSM-7610F, Tokyo, Japon). L'analyse des images a permis d'étudier la morphologie des particules, leur granulométrie, et l'homogénéité des suspensions.

3.3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.1 Effet des paramètres de traitement enzymatique sur la viscosité

La viscosité apparente du jus de goyave à chair blanche non traité est de $15,90 \pm 0,52$ mPa.s (Figure 28). Au bout de la troisième minute de traitement, celle-ci a diminué considérablement jusqu'à une viscosité de $1,32 \pm 0,20$ mPa.s pour toutes les concentrations en enzyme ; soit une diminution de plus de 90% de la viscosité initiale (Figure 28). Cette observation est semblable à celle faite par Nso et al. (1998), Kaur et al. (2011), Surajbhan et al. (2012), et Akesowan et Choonhahirun (2013). Les produits issus de l'hydrolyse de la pectine ont des degrés de polymérisation ($DP = 1 - 10$) et d'hydroxylation plus faibles que les siens. Ils ont par conséquent, des rayons hydrodynamiques et des pouvoirs de rétention d'eau plus faibles que ceux de la pectine. Il se produirait une libération des molécules d'eau dans le système entraînant sa dilution (Combo *et al.*, 2012). Le mélange qui en résulte aurait une meilleure aptitude à l'écoulement, justifiant ainsi les faibles valeurs de viscosité obtenues avec les échantillons issus de la dépectinisation (Akesowan et Choonhahirun, 2013). Ainsi, la diminution rapide de la viscosité apparente à partir de la troisième minute de réaction (Figure 28) pourrait être due à l'activité élevée et la faible affinité de l'isoforme PGII vis-à-vis des molécules de pectine ou d'acide polygalacturonique (Section 2.3.2.1) (Benen *et al.*, 1999).

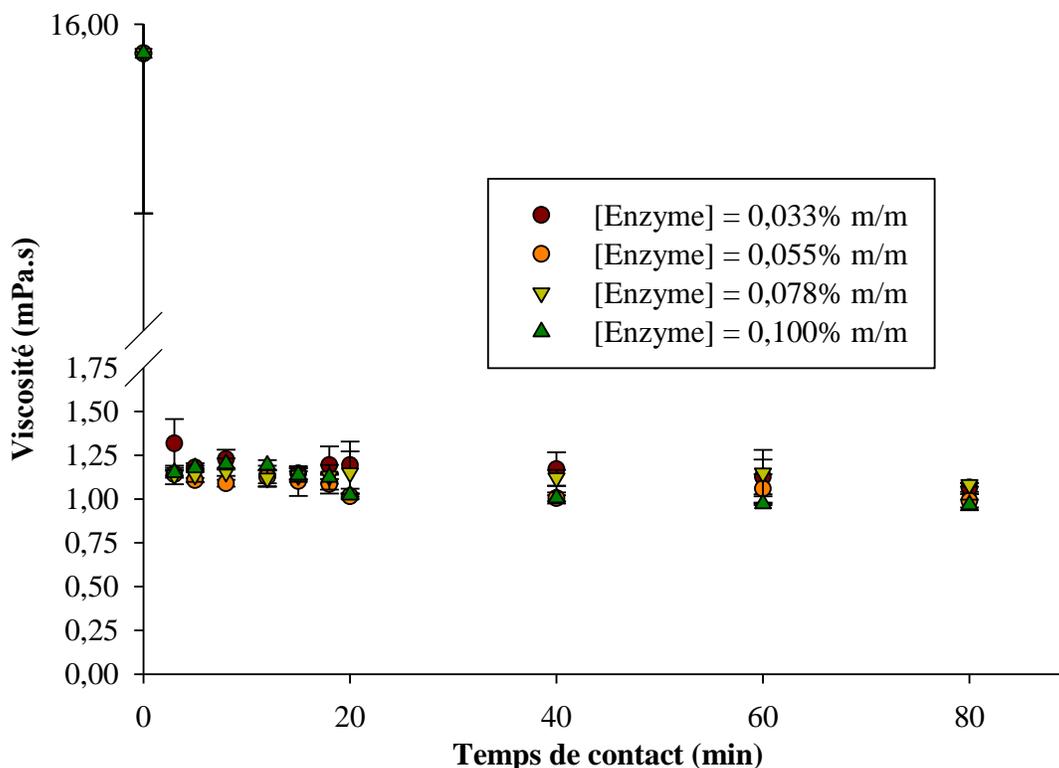


Figure 28: Viscosité apparente du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

La phase de diminution brusque de la viscosité est suivie d'une autre de diminution plus modérée et négligeable (Tableau 10, Annexe 4) entre la 3^{ème} et la 80^{ième} minutes (1,32 à 1,27 ; 1,15 à 0,97 ; 0,033% et 0,100% m/m d'enzyme respectivement) avec la valeur de la viscosité tendant asymptotiquement vers une valeur (0,9 mPa.s pour la concentration en enzyme de 0,100% m/m ; 1 mPa.s pour les autres concentrations) (Figure 28). Le phénomène observé au cours de cette phase pourrait être dû à la fois à la complémentarité entre les isoformes et au phénomène de processivité qui se dérouleraient tous deux au cours du temps de traitement (Section 2.3.2.1). Certaines isoformes (PGI et PGD) seraient sensibles à l'encombrement stérique dû à la taille du substrat et par conséquent son poids moléculaire. De ce fait, ces isoformes préféreraient des substrats à faible poids moléculaire provenant de l'hydrolyse des oligomères par les autres isoformes (Benen *et al.*,

1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). Nikolić et Mojovic (2007), de même que Combo et al. (2012) ont montré qu'avec l'augmentation du temps de traitement enzymatique (à partir de la quinzième minute de réaction), il y avait une diminution progressive de la quantité d'oligomères de degré de polymérisation compris entre 4 et 10 avec formation des mono, di et trimères. Ces substrats secondaires et leurs produits dérivés formeraient les composés rencontrés au cours de la phase de diminution non considérable de la viscosité. Ces composés décriraient une plage de rayons hydrodynamiques n'affectant pas considérablement la viscosité des échantillons.

Une augmentation négligeable de la viscosité est observée au bout de 90 min de traitement enzymatique (Figure 28). Celle-ci pourrait être due à la formation des particules après refroidissement des jus de goyave. Ces particules seraient le résultat du phénomène de coagulation observé du fait de l'interaction entre les molécules de protéines ou de polyphénols avec les mono, di et certains oligomères de l'acide galacturonique (Shomer, Yefremov et Merin, 1999). Le traitement thermique subi par les échantillons pour stopper la réaction enzymatique a pour conséquence la dénaturation des molécules de protéine. Celles-ci étant positivement chargées au pH naturel du jus de goyave à chair blanche ($3,5 \pm 0,2$) pourraient former des interactions ioniques avec les monomères et oligomères de l'acide galacturonique négativement chargés. Il en résulterait la formation des particules connues sous le nom de « trouble » (Shomer *et al.*, 1999, Rai *et al.*, 2006). La formation de ces particules pourrait être promue par la teneur élevée en monomères après 90 minutes de traitement enzymatique. Les particules obtenues auraient des effets sur la viscosité du milieu du fait de leur rayon hydrodynamique plus élevé que celui des monomères de l'acide galacturonique et molécules de protéines prises individuellement.

3.3.2 Effet des paramètres de traitement enzymatique sur la teneur en acide galacturonique

La teneur en acide galacturonique du jus de goyave à chair blanche brut est de $5161,510 \pm 216,461$ mg/L (Figure 29). Pour chacune des concentrations en enzyme, l'augmentation du temps de contact enzyme-purée s'accompagne d'une augmentation considérable de la teneur en acide galacturonique (Figure 29). Pour les concentrations de 0,078% et 0,100% m/m, trois zones distinctes peuvent être observées : une zone de variation non considérable de la teneur en acide galacturonique entre 3 et 18 minutes et entre 20 et 90 minutes ; une augmentation considérable entre 0 et 3 minutes.

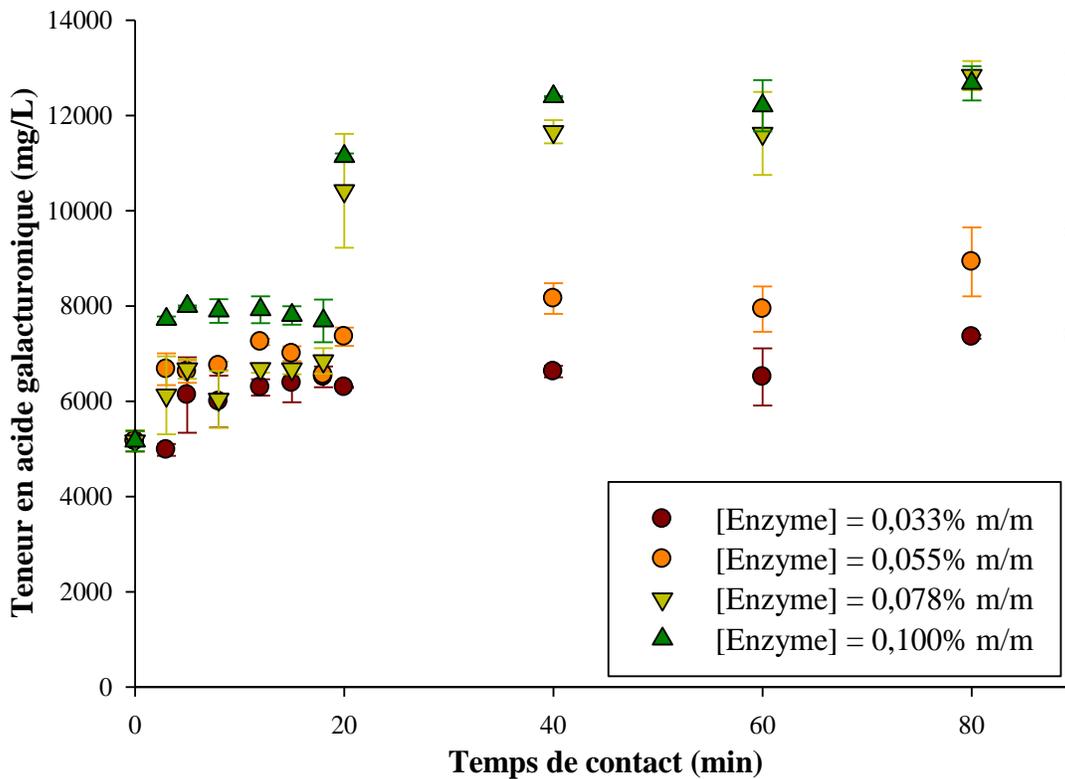


Figure 29: Teneur en acide galacturonique du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

L'augmentation de la teneur en acide galacturonique en fonction du temps de contact enzyme-purée pourrait être due à sa libération à la suite de la réaction d'hydrolyse de la pectine par les pectinases. Cette hydrolyse pourrait être faite suivant deux mécanismes : l'attaque simple et l'attaque multiple ou processivité (Section 2.3.2.1). Quel que soit le mécanisme impliqué, il s'en suit la libération des oligomères de faible poids moléculaire. Ces oligomères seraient par la suite hydrolysés par les différentes isoformes de PG ; le dernier produit libéré quel que soit le degré de polymérisation du substrat est le monomère de l'acide galacturonique (Benen *et al.*, 2003). Les travaux réalisés sur chacune des isoformes de PG ont montré que la courbe de progression des produits formés au cours de la réaction d'hydrolyse de la pectine présentait une augmentation des teneurs en oligomères suivie d'une diminution justifiant les phénomènes de processivité et/ou d'attaque simple. Cette diminution s'accompagnait de l'augmentation de la teneur en monomère (Pařenicová *et al.*, 1998; Benen *et al.*, 1999 ; Pařenicová *et al.*, 2000). Combo *et al.* (2012) utilisant une préparation industrielle de PG d'*A. niger* pour l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique ont mis en évidence l'apparition des monomères de l'acide galacturonique et des produits de degré de polymérisation compris entre 2 et 10 au bout de la cinquième minute de traitement. Ces chercheurs ont en outre montré qu'avec l'augmentation du temps de traitement, il y avait une diminution progressive (dans l'ordre décroissant de degré de polymérisation) de la quantité d'oligomères de degré de polymérisation compris entre 2 et 10. La libération de l'acide galacturonique dès la troisième minute de réaction pourrait être due à l'activité enzymatique élevée de la préparation commerciale utilisée dans cette étude. En effet, celle-ci était comprise entre 8000 et 12000 U/g ; elle est donc plus élevée que celle utilisée par Combo *et al.* (2012) (3160 U/mL). L'augmentation progressive de la teneur en acide galacturonique pour les concentrations en enzyme de 0,033% et 0,055% m/m pourrait être due à l'hydrolyse progressive des oligomères de DP supérieur à 1 avec

libération progressive des monomères de l'acide galacturonique. Le même phénomène pourrait expliquer la variation constatée au-delà de 20 minutes pour les concentrations de 0,078% et 0,100% m/m. En effet, Combo et al. (2012) ont observé qu'au bout de la 60^e minute de réaction, le milieu était saturé essentiellement de monomères de l'acide galacturonique avec de très faibles quantités de dimère et de trimère de l'acide galacturonique. Ils ont également montré une augmentation du rapport monomère/dimère au cours du temps de traitement traduisant une hydrolyse progressive des dimères en monomères. Avec la prédominance de ces deux oligomères, l'isoforme PGD est la plus prépondérante. Cette hydrolyse se ferait à une vitesse relativement faible ($0,67 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{kat}/\text{mg}$ et $0,67 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{kat}/\text{mg}$ pour 50 et 500 μM de dimère, respectivement) (Pařenicová *et al.*, 2000). Cette hydrolyse du dimère pourrait expliquer l'augmentation négligeable de la teneur en acide galacturonique observée avec les concentrations en enzyme 0,078% et 0,100% m/m (Tableau 11, Annexe 4).

Pour les concentrations en enzyme 0,078% et 0,100% m/m, une augmentation considérable et brusque est observée entre 18 et 40 minutes de réaction (Figure 29). Cette augmentation pourrait être le résultat du phénomène de processivité mettant en œuvre les processus d'hydrolyse de substrats, libération de produits de faible DP, migration de produit de DP élevé le long de la molécule d'enzyme vers le site actif et hydrolyse secondaire. Le mécanisme d'attaque simple mettant en œuvre la libération subséquente de produits suite à l'hydrolyse pourrait également se produire pendant cette période. La quantité d'enzyme étant élevée comparée aux deux autres concentrations, il se produirait, pour ces deux concentrations en enzyme, une accumulation plus rapide des oligomères de faible degré de polymérisation pendant les 20 premières minutes. Cette accumulation serait suivie de l'hydrolyse de ces oligomères en d'autres de degré de polymérisation plus faible. Cette accumulation couplée à l'hydrolyse secondaire des oligomères pourraient

expliquer la présence du premier palier observé sur la Figure 29 pour ces deux concentrations en enzyme. Nikolić et Mojovic (2007) ont montré que la quantité des oligomères de DP compris entre 3 et 8 augmentait au cours du temps, et après 120 min de traitement, la quantité d'oligomère de DP compris entre 6 et 8 diminuait. Ces phénomènes seraient observés dans le cadre de la présente étude et plus accélérés au regard de l'activité de la préparation enzymatique utilisée (8000 – 12000 U/g), soit au moins 8 fois celle de la préparation enzymatique utilisée par ces deux chercheurs (1000 U/g).

Pour un temps de contact enzyme-substrat donné, l'augmentation de la concentration en enzyme entraîne une augmentation considérable de la teneur en acide galacturonique (Figure 29). Cette observation est semblable à celle faite par Wang et al. (2007). Ces chercheurs ont montré que l'augmentation de la concentration en pectinase entraînait une production élevée d'acide galacturonique pour une durée donnée de traitement de fibre de coton. Pour une durée de traitement du jus de goyave, l'augmentation de la concentration en enzyme entraînerait une augmentation de la quantité d'extrémités réductrices comme l'ont montré Nikolić et Mojovic (2007) avec la pectine de pomme. Ces extrémités réductrices seraient celles des molécules de l'acide galacturonique et de leurs oligomères, tous libérés à l'issue de la réaction enzymatique. L'espacement progressif entre les courbes d'évolution de la quantité d'acides galacturoniques traduirait le fait que l'augmentation du temps de traitement entraînerait une libération progressive des produits de la réaction avec une augmentation de la concentration en enzyme. Au regard de ces différentes observations, il en résulte qu'avec l'augmentation de la concentration en enzyme, il pourrait se produire une diminution de l'effet de l'inhibition par les molécules de substrat.

3.3.3 Effet des conditions opératoires sur d'autres caractéristiques du jus de goyave

3.3.3.1 Effet du traitement enzymatique sur le pH du jus de goyave

Le pH du jus de goyave à chair blanche non dépectinisé est de $3,70 \pm 0,02$ (Figure 30). Le pH diminue considérablement avec la dépectinisation dès la troisième minute de traitement quelle que soit la concentration en enzyme (Figure 30). Cette diminution est suivie d'une variation négligeable entre 3 et 90 min.

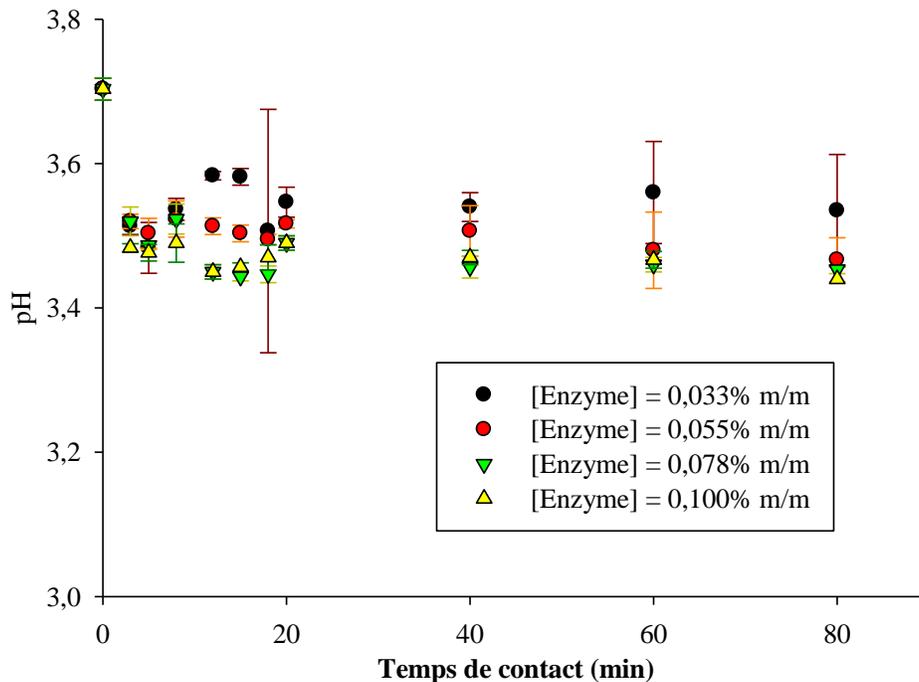


Figure 30: pH du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de traitement enzymatique

La diminution du pH au cours du traitement a également été rapportée par Akesowan et Choonhahirun (2013) et par Ahmed et al. (2014). Ils ont montré que le traitement enzymatique du jus de goyave à chair blanche entraîne une diminution de la valeur du pH pour toutes les combinaisons de facteurs.

La diminution du pH pourrait être expliquée par la libération de groupements carboxyliques (groupements acides) au cours de l'hydrolyse de la pectine. Les zones lisses de la pectine qui constituent son squelette, est un polymère d'acides galacturoniques liés par des liaisons α (1 – 4) galactosidiques. L'hydrolyse de la pectine par les pectinases s'accompagne de la libération des oligomères de l'acide galacturonique. Les mono (Figure 4a), di, tri et oligomères (Figure 4b) ont tous une extrémité réductrice pouvant entraîner une diminution du pH. De plus, l'acide galacturonique possède deux groupements carboxyliques notamment au niveau des carbones C1 et C6 (Figure 4a). L'hydrolyse des groupements méthoxyles par la Pectine Estérase (PE) entraîne la formation d'un groupement carboxylique en position C6 (Figure 5) (Garg *et al.*, 2016). Cette réaction de déméthoxylation est indispensable pour l'activité des polygalacturonases qui hydrolyseront les oligomères de l'acide galacturonique au niveau des liaisons galactosidiques avec libération d'une extrémité réductrice (Figure 6). Certaines isoformes de PG préféreraient des substrats partiellement déméthoxylés de pectine ; le groupement méthoxyl décrivant un effet inhibiteur pour leur activité du fait de sa conformation (effet d'encombrement stérique) (Benen *et al.*, 2003).

La variation non considérable du pH observée entre 3 et 90 min pour toutes les concentrations en enzyme (Figure 30) pourrait être expliquée par l'effet tampon exercé par les molécules de l'acide galacturonique issues de l'hydrolyse de la pectine (Section 3.3.2). Ce monomère est une molécule possédant deux groupements carboxyliques et pourrait de ce fait être considéré comme un acide organique faible (Figure 4a). Dans le milieu réactionnel, cet acide coexisterait avec sa base conjuguée. L'effet tampon est exprimé de façon optimale lorsque la valeur du pH du milieu est de l'ordre de $pK_a \pm 0,5$; cependant la limite maximale de pH pour l'expression de l'effet tampon est de $pK_a \pm 1$ (Dennison, 2002 ; Stoll et Blanchard, 2009). Le pK_a

de l'acide galacturonique est de 3,47 (Holvik et Høiland, 1977). L'effet tampon exercé par l'acide galacturonique et l'espèce basique pourrait s'expliquer par le fait que les valeurs de pH des jus de goyave à chair blanche obtenus après traitement enzymatique sont toutes comprises dans la plage d'expression optimale d'activité ($2,97 \leq \text{pH} \leq 3,97$).

L'augmentation de la concentration en enzyme entraîne une diminution du pH pour une durée de traitement donnée (Figure 30). Ceci pourrait s'expliquer qu'avec l'augmentation de la concentration en enzyme, il y aurait une production plus considérable de monomères de l'acide galacturonique (Nikolić et Mojovic, 2007 ; Wang *et al.*, 2007). La diminution du pH avec l'augmentation de la concentration en enzyme pourrait également être due à la libération des molécules d'acide ascorbique au cours de l'hydrolyse de la pectine (Akesowan et Choonhahirun, 2013). La différence négligeable observée entre les concentrations en enzyme de 0,078% et 0,100% m/m (Tableau 3, Annexe 4) corrobore avec l'observation faite pour la variation de la teneur en acide galacturonique en fonction du temps pour ces deux concentrations.

3.3.3.2 Effet du traitement enzymatique sur la conductivité électrique du jus de goyave

La conductivité électrique du jus de goyave à chair blanche initial est de $1574,33 \pm 18,48$ mS/cm (Figure 31). Pour toutes les concentrations en enzyme, trois tendances sont observées en général selon les intervalles de temps (Figure 31). La première plage de temps est celle comprise entre 0 et 5 min où le traitement enzymatique entraîne une augmentation non considérable de la conductivité du jus de goyave à chair blanche par rapport au jus non traité. Cette augmentation non significative est suivie d'une diminution négligeable de la conductivité entre 5 et 8 min (Tableau 4, Annexe 4). La troisième plage entre 8 à 90 min est caractérisée par une variation non significative de la conductivité pour toutes les concentrations en enzyme.

L'augmentation de la conductivité électrique pendant les cinq premières minutes pourrait être expliquée par la libération des ions calcium (Ca^{2+}) au cours de l'hydrolyse. La pectine se présente dans les systèmes biologiques sous forme de réseau complexe ayant une structure alvéolaire. Les chaînes de pectine (Figure 32) à cause de leur charge négative peuvent être chélatées par des ions calcium (Prasanna *et al.*, 2007). Au cours de l'hydrolyse de la pectine, l'apparition des produits de la réaction résulterait de la destruction de ces réseaux avec libération éventuelle des ions calcium dans le milieu réactionnel entraînant l'augmentation de la conductivité.

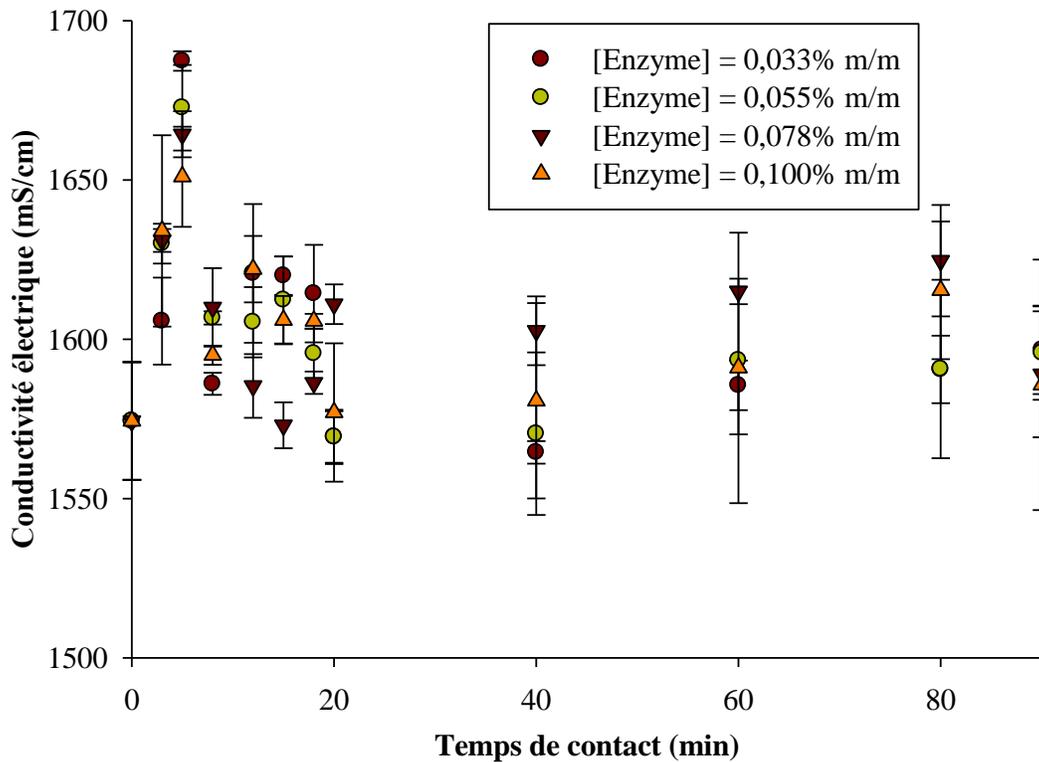


Figure 31: Conductivité électrique en fonction du temps de contact enzyme-purée.

La variation négligeable entre 8 et 90 min pourrait être due aux phénomènes de chélation entre les ions calcium libres et les groupements anioniques des monomères et oligomères de l'acide galacturonique issus de l'hydrolyse de la pectine. Ces phénomènes d'interaction pourraient être

impulsés par leur effet tampon. Au pH des échantillons de jus de goyave, l'espèce conjuguée de l'acide galacturonique pourrait être prépondérante. Celle-ci est négativement chargée et pourrait être impliquée dans des interactions ioniques avec les cations. Ces interactions auraient pour conséquence de réguler l'effet tampon en promouvant la libération des ions H^+ dans le milieu réactionnel, car elles contribueraient à diminuer la quantité de l'espèce négative (Dennison, 2002).

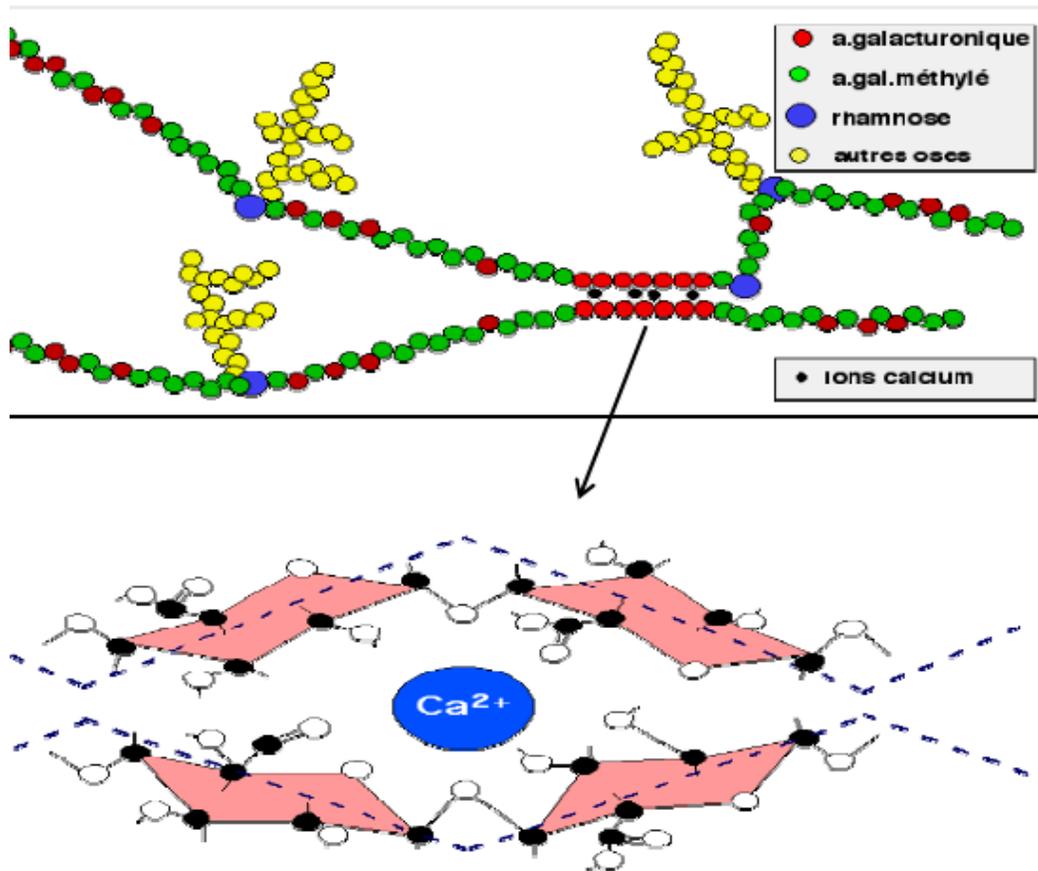


Figure 32: Liaison de deux chaînes de l'acide galacturonique non méthylé en présence de calcium : Le calcium bivalent peut se lier à 9 oxygènes électro-négatifs et assurer ainsi la liaison entre 2 chaînes de pectine. Source : Bekhouche (2006)

3.3.3.3 Effet du traitement enzymatique sur la valeur de TSS (Sucres Solubles Totaux) du jus de goyave

La teneur en sucres solubles Totaux du jus de goyave à chair blanche initial est de $1,7 \pm 0,1$ (Figure 33). Le traitement enzymatique entraîne une augmentation considérable de la teneur en sucres solubles totaux dès la troisième minute de réaction pour toutes les concentrations en enzyme (Figure 33). Au-delà de 3 min et jusqu'à 90 min, la teneur en TSS décrit une variation non significative à l'issue de la dépectinisation (Tableau 5, Annexe 4).

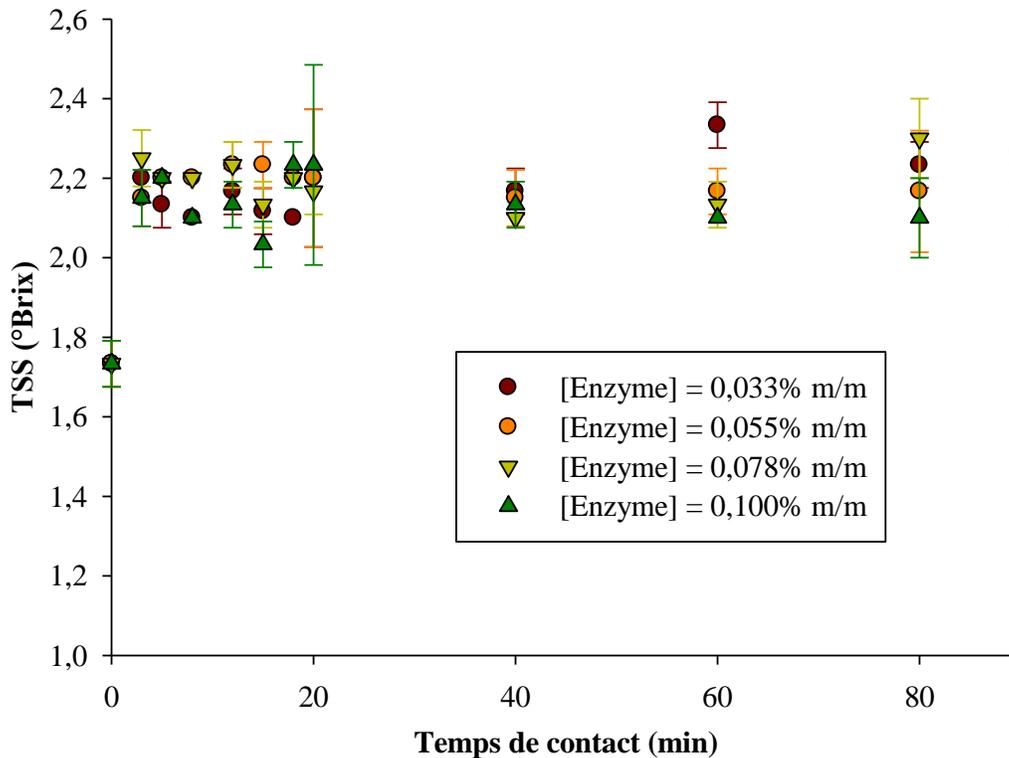


Figure 33: Teneur en Sucres Solubles du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

L'augmentation de la teneur en TSS par rapport au jus de goyave à chair blanche initial a également été rapportée par Akesowan et Choonhahirun (2013) et Ahmed et al., (2014). Elle

pourrait être due à la libération des molécules de glucose issues de l'hydrolyse de l'amidon de la goyave à chair blanche par les amylases endogènes (Jain *et al.*, 2001).

3.3.3.4 Effet du traitement enzymatique sur la couleur des échantillons de jus de goyave

La valeur de la couleur du jus de goyave à chair blanche initial est de $9,828 \pm 0,315$ (Figure 34). Pour chaque concentration en enzyme, deux plages de temps sont distinctes selon les tendances observées de la couleur : une plage où il se produit une augmentation de la couleur et une seconde où celle-ci n'enregistre pas une variation considérable. Dans l'ensemble, l'augmentation de la couleur se produit pendant les 12 premières minutes. Au-delà de cette durée, la couleur varie de façon négligeable pour toutes les concentrations en enzyme (Figure 34).

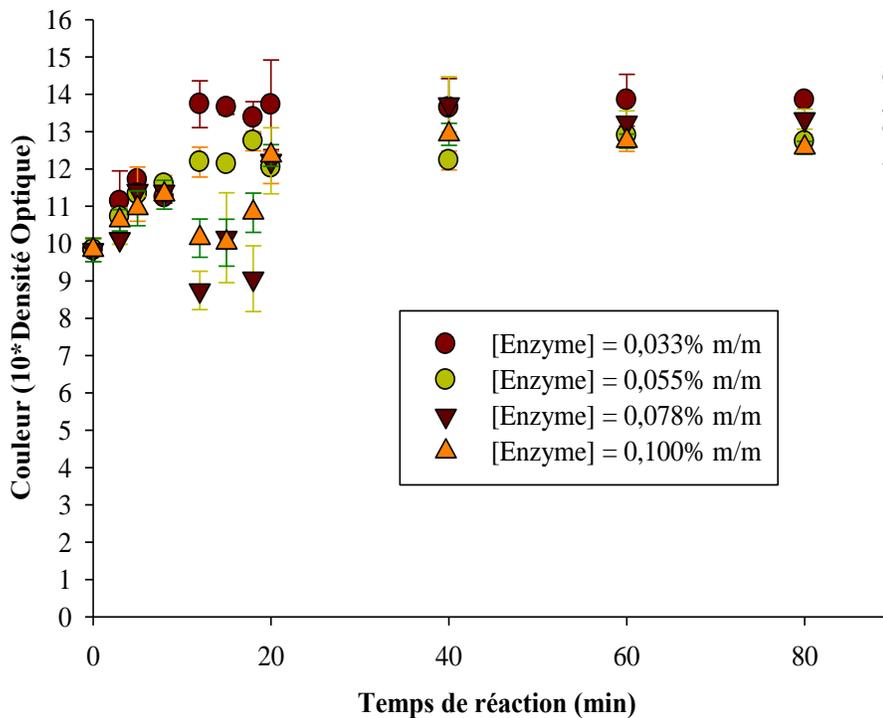


Figure 34: Couleur du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

L'augmentation de la couleur au cours du traitement pourrait être due au brunissement enzymatique du jus de goyave à chair blanche initial, résultant de l'oxydation des composés phénoliques par les polyphénol-oxydases (PPO) présentes dans le jus de goyave à chair blanche initial. Razzaque et al. (2000) ont mis en évidence la présence des PPO dans la purée de goyave. Celles-ci sont des enzymes qui catalysent la conversion des composés possédant un noyau phénolique en *o*-quinones. Elles possèdent dans leur structure un atome de cuivre comme groupement prosthétique qui est très indispensable pour leur activité. La conversion des composés phénoliques en quinones nécessiterait la présence de l'oxygène et pourrait se dérouler en deux étapes précises (Yoruk et Marshall, 2003 ; Taranto *et al.*, 2017). La première est l'hydroxylation du noyau phénolique en position ortho d'un groupement hydroxyl d'un composé monophénolique. Au cours de cette réaction qui a pour substrats le phénol et l'oxygène, un atome d'oxygène est introduit dans le composé monophénolique tandis que l'autre atome d'oxygène est réduit en eau. Cette réaction est connue sous le nom d'activité monophénolase ou activité hydroxylase ou activité crésolase. Elle est facilitée par la présence d'acide ascorbique ou de composés *o*-diphénoliques qui agiraient comme donneur d'électron. Le produit de cette première réaction est un composé *o*-diphénolique. La deuxième étape est connue sous le nom d'activité diphenolase ou activité oxydase ou activité catécholase. Elle est une réaction d'oxydation du composé *o*-diphénolique précédent avec formation d'un composé *o*-quinone qui serait fortement actif. Il subirait des réactions non-enzymatiques de condensation avec des molécules d'acide aminé, de protéines et d'autres composés phénoliques pour donner des polymères complexes colorés connus sous le nom de mélanine ou pour former des polymères avec des résidus de protéines tels que les groupements –SH ou –NH₂. Au cours de cette réaction où deux composés *o*-diphénoliques sont oxydés en deux *o*-quinones, les deux atomes d'oxygène sont réduits en molécules d'eau. La première réaction

impliquerait forcément la deuxième, mais l'inverse ne serait pas toujours vérifié. Les PPO comprennent trois groupes d'enzyme : les tyrosinases, les catechol oxydase et les laccases. Les dernières seraient les seules à catalyser l'oxydation d'un composé *p*-diphénolique. Les tyrosinases possèdent à la fois les activités crésolase et catécholase. Les catechol oxydases catalysent la conversion des *o*-diphénols en *o*-quinones (Yoruk et Marshall, 2003 ; Taranto *et al.*, 2017). Avant le traitement enzymatique, la purée de goyave à chair blanche n'a pas subi un traitement thermique préliminaire afin de stopper les réactions enzymatiques s'y produisant. De ce fait, les polyphénol-oxydases présentes dans la purée seraient toujours actives durant le traitement enzymatique qui s'est déroulé dans les conditions aérobies (le réacteur n'a pas été fermé). L'agitation au cours du traitement aurait permis le brassage de l'oxygène ambiant dans le jus de goyave, entraînant l'augmentation de la teneur en oxygène dissout. Ce qui aurait augmenté la teneur en substrat pour l'oxydation des polyphénols. En plus de cette dissolution de l'oxygène, l'acide ascorbique présent dans le milieu aurait également joué un rôle dans le brunissement en promouvant l'activité monophénolase. A ces conditions aérobies couplées à la présence d'acide ascorbique pourraient s'ajouter la température et le temps de réaction. Le traitement enzymatique a été fait à la température de $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Cette température est proche à la température optimale d'activité de la polyphénol-oxydase de la goyave à chair blanche qui est de 48°C . Bien que le pH du jus soit inférieur à celui optimal des PPO de goyave à chair blanche (pH 8), celles-ci seraient toujours actives avec une activité relative de l'ordre de 10% (Razzaque *et al.*, 2000).

Au cours du traitement, la valeur de la couleur augmente pour une concentration en enzyme donnée (Figure 34). L'augmentation de la densité optique (couleur) pourrait être due au phénomène de brunissement non enzymatique. Ce phénomène est le résultat de l'interaction entre les acides aminés ou les protéines avec les sucres réducteurs présents dans le jus au cours du

traitement thermique destiné à inactiver les enzymes. Le jus de goyave à chair blanche contient des molécules de glucose, de galactose et d'autres sucres réducteurs. Au cours du traitement thermique (95°C / 5 min), les fonctions carboxyles de ces sucres réagiraient avec les groupements aminés des protéines. Ces interactions entraîneraient des réactions en séquence avec formation des produits intermédiaires tels que les imines, les 1 – amino – 1 désoxycétoses ou produits d'*Amadori*. Ces produits seraient par la suite impliqués dans d'autres types de réaction entraînant la formation d'autres composés tels que les déoxyosones. Les différents arrangements et les réactions que peuvent subir ces composés peuvent aboutir à la formation des composés colorés appelés mélanoïdines (Belitz, Grosch et Schieberle, 2009).

L'augmentation de la concentration en enzyme n'a pas d'effet considérable sur la couleur des échantillons pour un temps donné de traitement. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la préparation enzymatique industrielle utilisée serait majoritairement constituée de pectinases. L'augmentation de la concentration en pectinase n'entraînerait pas une variation considérable de la concentration en polyphénol-oxydase déjà présente dans le jus de goyave.

3.3.3.5 Effet du traitement enzymatique sur les teneurs en polyphénols et protéines du jus de goyave

La teneur des composés phénoliques du jus de goyave à chair blanche initial est de 60,39 ± 0,41 mgGAE/100mL (Figure 35). La teneur en polyphénols diminue au cours du traitement enzymatique pour toutes les concentrations en enzyme comparée à celle du jus de goyave à chair blanche initial (Figure 35). Entre 20 et 90 min, la teneur en polyphénols ne varie pas considérablement avec le temps pour toutes les concentrations en enzyme (Tableau 8, Annexe 4).

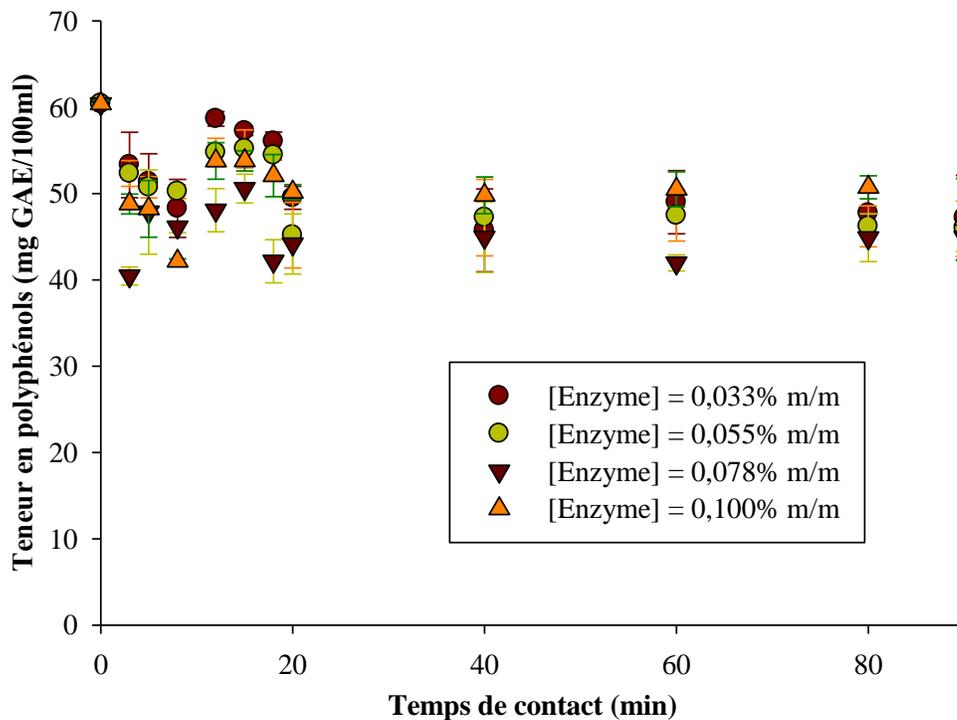


Figure 35: Teneur en polyphénols du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

La diminution de la teneur en polyphénols dans les échantillons traités a été rapportée par Sagu et al. (2014) dans le cas du traitement enzymatique du jus de banane. La goyave à chair blanche renfermerait plusieurs types de composés phénoliques : les anthocyanes, les flavonoïdes et les proanthocyanidines. Ces composés renferment plusieurs groupements hydroxyls (au moins 3) susceptibles d'être impliqués dans plusieurs types de réaction (Flores *et al.*, 2015). La diminution de la teneur en polyphénol pourrait être entre autres due à leur oxydation en *o*-quinones par la PPO. Par cette oxydation, les groupements hydroxyls des composés phénoliques initiaux seraient oxydés en quinones. Ce nouveau groupement aurait une faible réactivité avec le mélange d'acides phosphostungstique et phosphomolybdique ; il n'affecterait pas considérablement la réduction de ce mélange. Il en résulterait la formation d'un complexe bleu moins coloré que celui du composé phénolique non oxydé (Blainski *et al.*, 2013). La formation de ces *o*-quinones

conduirait à des réactions de condensation et de complexation avec les acides aminés et les protéines avec pour conséquence la formation des mélanines. La diminution de la teneur en polyphénols pourrait également être due à la non réactivité des polyphénols impliqués dans la formation des complexes avec d'autres molécules telles que les protéines et d'autres polyphénols. La non réactivité de ces polyphénols traduirait la non ou faible réduction du réactif de Folin Ciocalteu à cause de l'implication de leurs groupements hydroxyles dans la formation des complexes. En effet, les molécules de polyphénols agiraient comme des ponts et la « colle » pour promouvoir la réticulation des chaînes de protéines, entraînant de ce fait la formation de trouble ou tannin (McLellan et Padilla-Zakour, 2005). Ce phénomène pourrait être accéléré par l'ajout des enzymes au cours du traitement, entraînant l'augmentation de la teneur en protéines. De plus, les polyphénols pourraient être impliqués dans la formation des troubles due à leur polymérisation pour former des complexes plus larges (McLellan et Padilla-Zakour, 2005).

La teneur en protéine du jus de goyave à chair blanche initial est de $615,681 \pm 28,575$ (Figure 36). Le traitement enzymatique entraîne une diminution de la teneur en protéines des échantillons comparée à celles du jus de goyave à chair blanche brut pour toutes les concentrations en enzyme (Figure 36). Au cours du traitement, la teneur en protéine ne décrit pas un profil monotone avec l'augmentation du temps pour toutes les concentrations en enzyme.

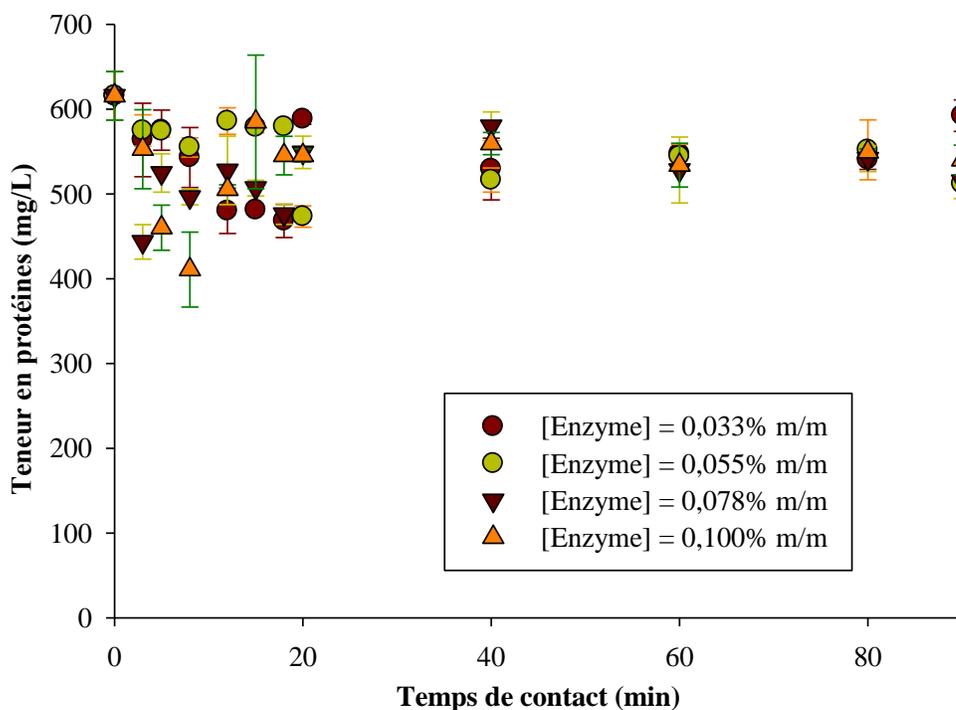


Figure 36: Teneur en protéines du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

La diminution des teneurs en protéines des échantillons traités par rapport à l'échantillon initial pourrait être due à la non réactivité avec les réactifs (le Réactif de Folin Ciocalteu et la solution de Lowry) utilisés pour leur détection et des complexes que ces protéines formeraient. Ces phénomènes de complexation entraîneraient une indisponibilité dans le milieu réactionnel des molécules de protéines. Cette diminution pourrait entre autres s'expliquer par l'oxydation de certains résidus de tyrosine des protéines par les PPO (polyphénol oxydases) (Yoruk et Marshall, 2003 ; Taranto *et al.*, 2017). En effet cet acide aminé présente dans sa structure un noyau aromatique ayant un groupement hydroxyl en position *para* par rapport au carbone 1 du cycle. Cette position du groupement hydroxyl ferait de la tyrosine un substrat idéal pour l'expression de l'activité monophénolase. La réduction du réactif de Folin Ciocalteu étant entre autres dépendante de la présence de tyrosine, un groupement de tyrosine oxydé en *o*-quinones par les PPO serait donc

indisponible pour la formation de couleur bleue caractéristique du réactif de Folin Ciocalteu réduit. La diminution de la teneur en protéine pourrait également être due à la formation des mélanines entre les composés *o*-quinones issus de l'oxydation des polyphénols et les molécules de protéines. La formation de ces mélanines impliquerait les résidus – SH ou – NH₂. Ces résidus – SH sont indispensables pour la réduction du réactif de Folin Ciocalteu ; leur implication dans la formation de mélanine entraînerait une diminution de l'intensité de la coloration bleue (Noble et Bailey, 2009).

La diminution de la teneur en protéines pourrait être expliquée l'implication des protéines dans plusieurs types d'interactions. Le traitement thermique appliqué au jus à l'issue du traitement enzymatique permet d'inactiver les enzymes. Cette inactivation a pour conséquence la coagulation des molécules de protéines entraînant une augmentation de la turbidité du jus (Shomer *et al.*, 1999). La teneur en protéine décrit une tendance contraire à celle de la couleur (Figure 34). Ceci pourrait traduire l'implication des résidus de certains acides aminés dans les réactions entre ces derniers et les produits intermédiaires issus de la réaction de Maillard. Les groupements de la lysine et de l'arginine peuvent être impliqués dans certaines interactions avec les sucres ou leurs produits dérivés (4 – deoxyosone) avec pour conséquence la diminution de la valeur nutritionnelle de la protéine (Belitz *et al.*, 2009).

3.3.3.6 Effet du traitement enzymatique sur la capacité antioxydante du jus de goyave

La capacité antioxydante du jus de goyave à chair blanche initial est de $94,671 \pm 0,325\%$ (Figure 37). Le traitement enzymatique n'a pas un effet considérable sur la capacité antioxydante des échantillons comparés à celle du jus non traité (Figure 37).

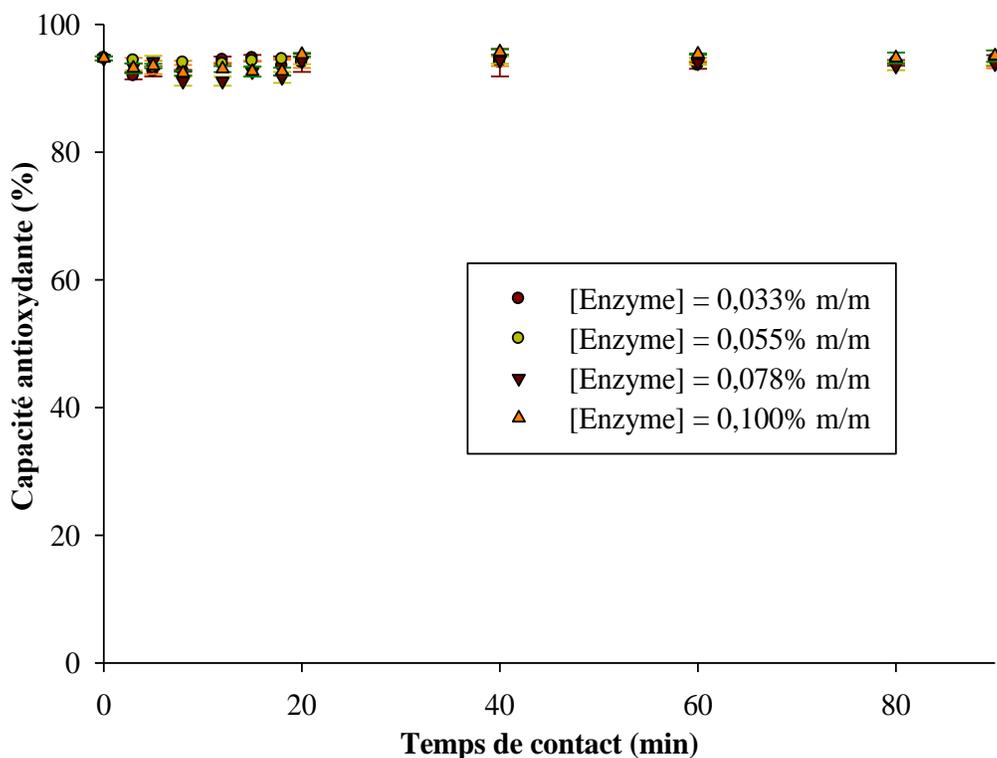


Figure 37: Capacité antioxydante du jus de goyave à chair blanche en fonction du temps de contact enzyme-purée

La capacité antioxydante est celle exercée par les composés solubles dans l'éthanol utilisé pour la précipitation des particules. La capacité antioxydante serait influencée par les composés phénoliques solubles dans l'alcool et l'acide ascorbique qui en serait l'un des contributeurs majeurs. Les composés phénoliques qui contribuent à la capacité antioxydante seraient ceux qui sont libres, étant donné que ceux complexés sous forme de particules sédimenteraient au cours de la centrifugation. Les composés phénoliques de la goyave à chair blanche présenteraient l'aptitude à donner des atomes d'hydrogène ou à transférer les électrons, contribuant par conséquent à la capacité antioxydante (Flores *et al.*, 2015). Une forte corrélation positive a été mise en évidence entre la capacité antioxydante, les composés phénoliques et l'acide ascorbique montrant que ces deux familles de composé sont des contributeurs essentiels à la capacité antioxydante de la goyave.

Cette corrélation est caractéristique des fruits ayant des teneurs élevées en acide ascorbique comme la goyave à chair blanche et l'orange (Thaipong *et al.*, 2006).

3.3.3.7 Optimisation des paramètres de dépectinisation

L'optimisation du temps de contact enzyme-purée et de la concentration en pectinases s'appuyant sur les critères obtenus dans la littérature, et par comparaison des caractéristiques physicochimiques des échantillons, a permis d'obtenir les valeurs décrites dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Combinaison des facteurs ou conditions opératoires répondant aux critères du cahier de charges

Critères	[Enzyme] (% m/m)	Temps de contact (min)
Pourcentage de réduction de la viscosité $\geq 91\%$	0,033 – 0,100	3 – 90
$3,41 \leq \text{pH} \leq 3,46$	0,078 – 0,100	40 – 90
Taux d'hydrolyse de la pectine $\geq 77,7\%$	0,055	40 - 90
	0,078	40 - 90
	0,100	20 – 90
Teneur en acide galacturonique la plus élevée possible	0,078 – 0,100	40 – 90

Le pourcentage minimal de réduction de la viscosité de 91% est respecté par tous les points expérimentaux de l'étude. Les durées de traitement comprises entre 40 et 90 min pour les concentrations de 0,055% m/m et 0,078% m/m, et entre 20 et 90 min pour 0,100% m/m d'enzyme ont permis d'obtenir un taux minimal d'hydrolyse de la pectine de 77,7%. Seules les concentrations comprises entre 0,078% et 0,100% m/m ont permis d'obtenir un pH compris entre 3,41 et 3,46 pour des temps de contact enzyme-purée compris entre 40 et 90 min. Une différence non significative a été observée entre 0,078% et 0,100% pour la teneur en acide galacturonique

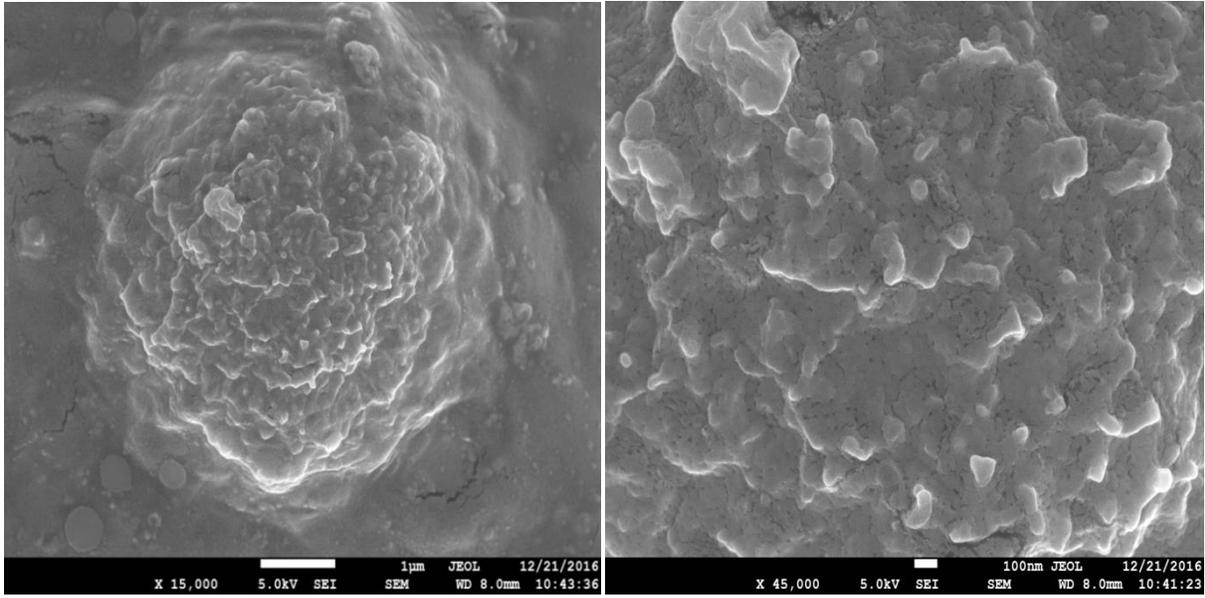
entre 40 et 90 min. Par contre, celle observée entre 0,055% et 0,078% est significative (Tableau 11, Annexe 4). Pour les autres caractéristiques, aucune différence significative n'est observée pour toutes les conditions opératoires de dépectinisation. Toutes ces observations ont permis de définir les plages optimales des paramètres de dépectinisation (Tableau 6).

Tableau 6 : Plages optimales des paramètres de dépectinisation enzymatique de la goyave

Paramètres ou facteurs	Plages ou valeurs optimales
Temps de contact enzyme-purée (min)	40 – 90
Concentration en pectinases (% m/m)	0,078 – 0,100
Température (°C)	43 ± 2°C
Vitesse d'agitation (rpm)	1000

3.4 Analyse des échantillons par la Microscopie électronique à balayage à émission de champ

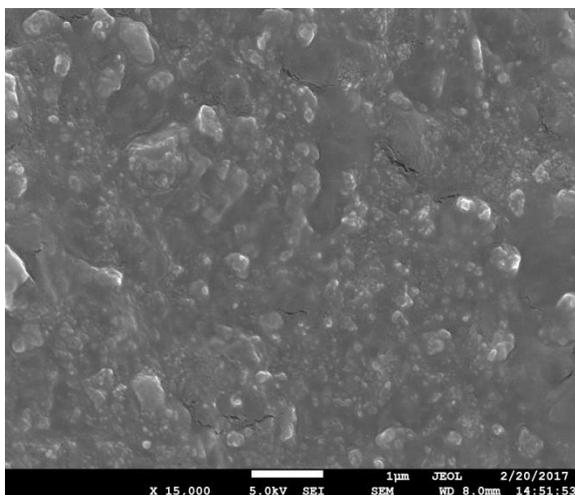
Afin de visualiser les différentes suspensions, celles-ci ont été analysées par le Microscope électronique à balayage à émission de champ (Field Emission Scanning Electron Microscopy – FESEM). Les images des différents échantillons pour des temps de traitement enzymatique respectifs de 8, 20 et 90 min (Figure 39) ont permis de les comparer avec la purée non traitée (Figure 38).



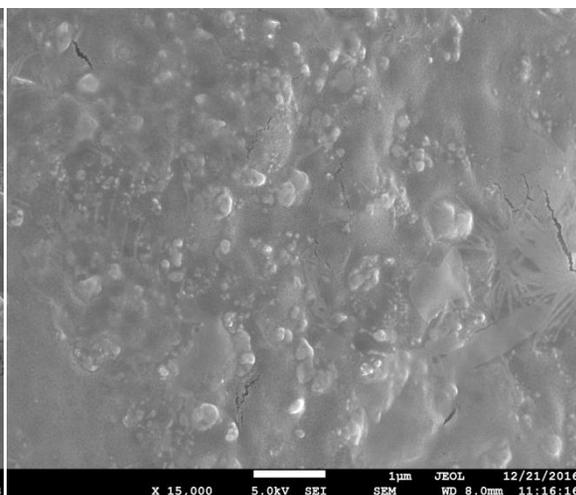
(a)

(b)

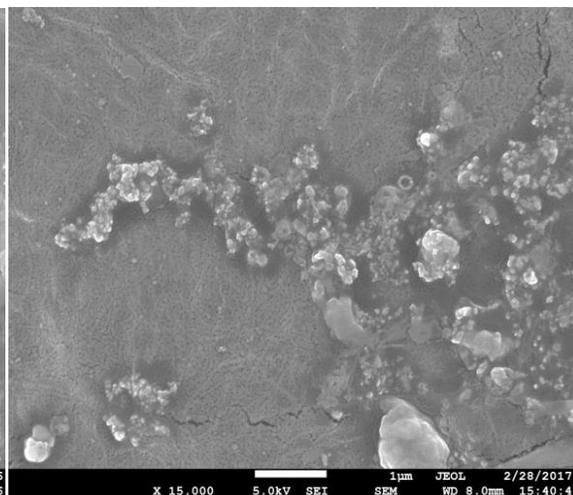
Figure 38: Images FESEM de la purée de goyave à chair blanche sans aucun traitement enzymatique : (a) et (b) Agrandissement de 15000 et 45000 respectivement



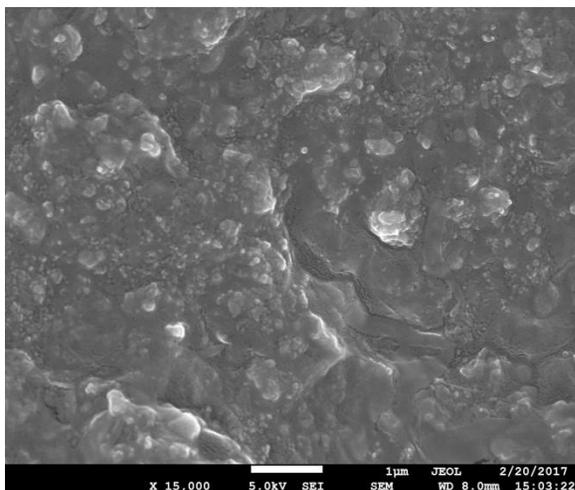
(I.A)



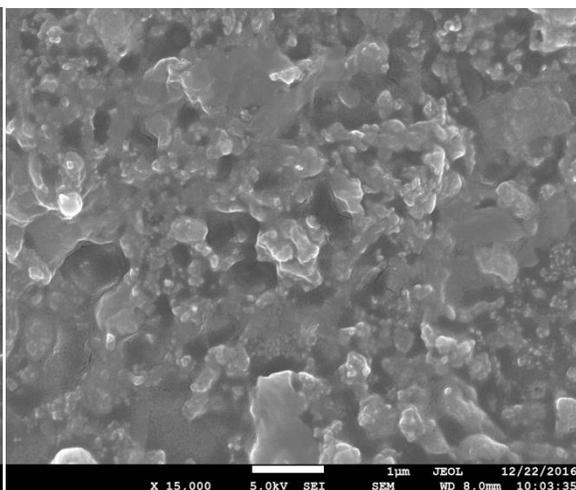
(I.B)



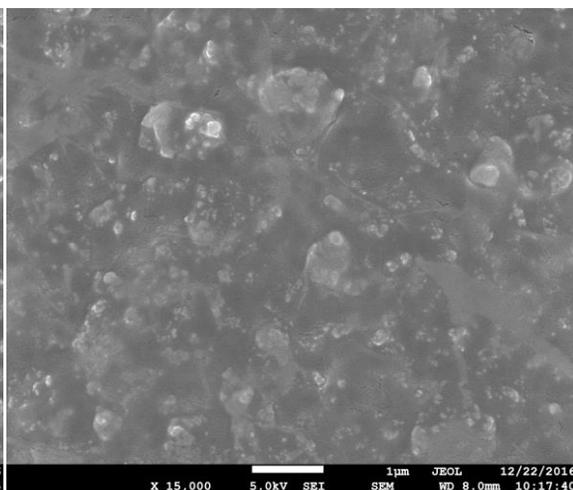
(I.C)



(II.A)



(II.B)



(II.C)

(Voir la légende à la page 128)

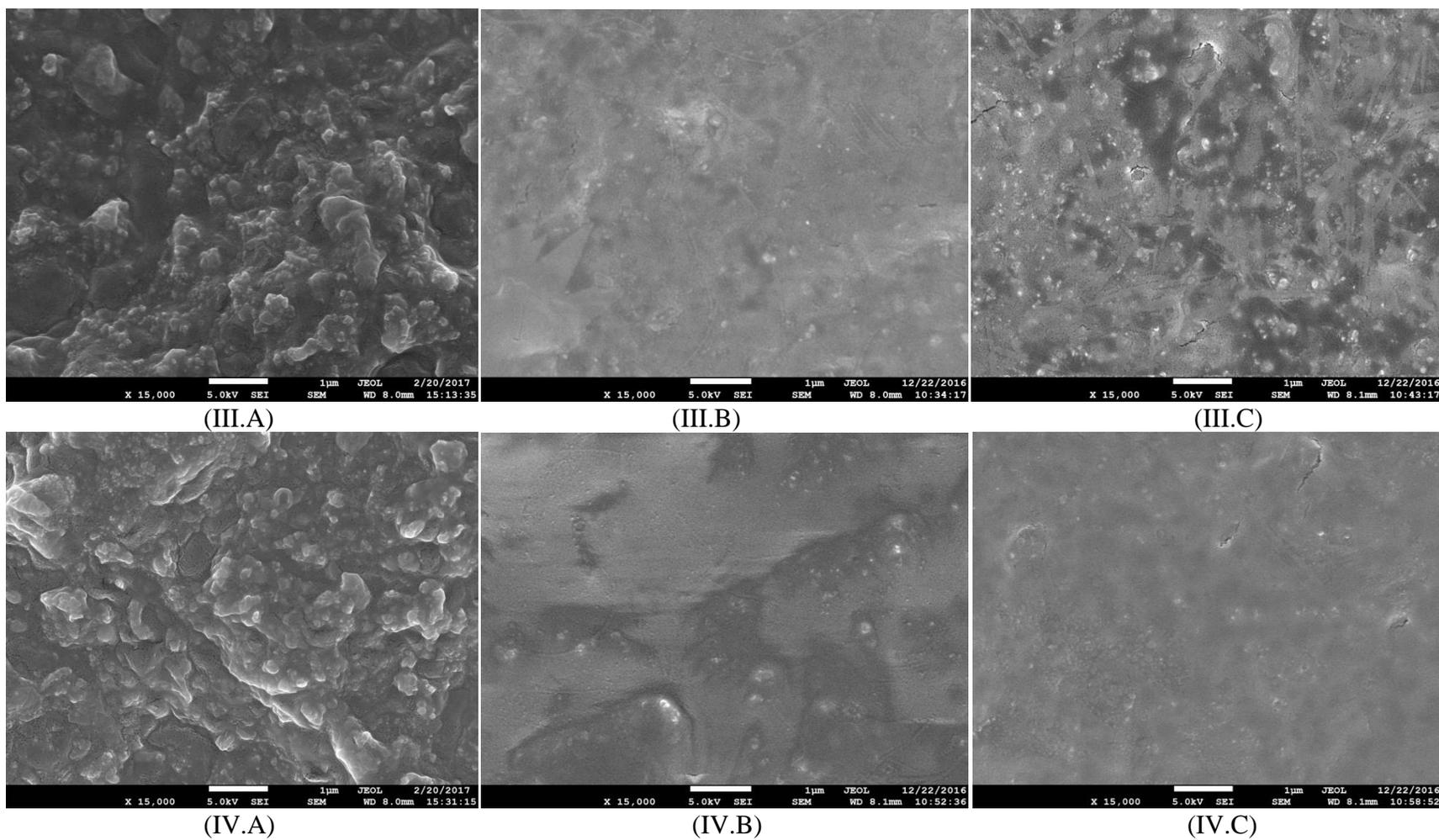


Figure 39: Images FESEM des échantillons de jus de goyave. (I), (II), (III) et (IV) Images des échantillons de goyave à chair blanche ayant subi un traitement enzymatique avec 0,033% m/m, 0,055% m/m, 0,078% m/m et 0,100% m/m de concentration en enzyme, respectivement. Les indices A, B et C représentent respectivement les temps de traitement enzymatique de 8, 20 et 90 minutes pour une concentration donnée en enzyme.

L'extrait sec de la purée de goyave à chair blanche non traitée présente des particules de granulométries différentes (Figure 38a). La répartition des particules est hétérogène. Certaines particules se présentent sous forme d'amas avec des irrégularités (aspérités). D'autres particules par contre ont une forme ronde ; cependant leur agrandissement (Figure 38b) révèle qu'elles sont également pourvues de plusieurs aspérités. Ces particules représenteraient un amas de tissus constitués de plusieurs polysaccharides et de protéines formant un réseau complexe. La pectine est le constituant majeur de ce réseau dans la paroi cellulaire primaire (35% m/m en base sèche). Elle a tendance, du fait de sa solubilité dans l'eau, de même que les protéines, à former un gel autour des autres constituants de la paroi et jouant ainsi le rôle de liant (Prasanna *et al.*, 2007).

Le traitement enzymatique entraîne la désintégration des particules observées sur les images de l'échantillon brut (Figure 38a) avec pour conséquence la réduction du spectre granulométrique de ces particules (Figure 39). Les échantillons de jus de goyave à chair blanche après 8 minutes de traitement pour toutes les concentrations en enzyme présentent une répartition presque identique des particules. Ceci montre que cette durée de traitement n'est pas encore suffisante pour mettre en évidence les différences dues à la variation de la concentration en enzyme. Pour une concentration en enzyme donnée, l'augmentation de la durée de traitement s'accompagne d'une apparition progressive de couches homogènes entourant les particules (Figure 39). Ces couches représenteraient la phase liquide, montrant ainsi que le traitement enzymatique s'accompagne de la liquéfaction du mélange due à la libération des molécules d'eau. Cette libération des molécules d'eau se produirait au cours de l'hydrolyse de la pectine (composé de capacité de rétention d'eau et de rayon hydrodynamique élevés par rapport aux monomères issus de sa dégradation) avec pour conséquence l'apparition d'une phase liquide entraînant la diminution de la viscosité (Akesowan et Choonhahirun, 2013). L'hydrolyse de la pectine s'accompagnerait

en outre d'une destruction du réseau de macromolécules avec pour conséquence une libération de celles-ci dans le milieu. Les images des échantillons de 90 minutes présentent une proportion plus élevée de la phase liquide. L'analyse des échantillons de 90 minutes révèle que celui correspondant à la concentration de 0,100% m/m présente une proportion plus élevée de la phase liquide. Cet échantillon présente moins de particules et a une meilleure homogénéité. Ceci peut s'expliquer par le fait que cet échantillon correspond à la combinaison des valeurs maximales de temps de traitement et de concentration en enzyme. Les échantillons correspondant à toutes les concentrations en enzyme présentent encore des particules au bout de 90 minutes de traitement. Cependant, la granulométrie des particules, leur répartition ou leur regroupement varient avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Pour cette combinaison, la granulométrie des particules diminue, ces dernières sont plus dispersées.

L'observation des images des échantillons de 0,078% et 0,100% permet de mettre en évidence les différences non considérables des caractéristiques physicochimiques obtenues. Ces images montrent une uniformité relativement semblable pour ces différentes combinaisons. Elles soutiennent la sélection de 0,078% comme concentration optimale pour la dépectinisation de la purée de goyave.

3.4 CONCLUSION PARTIELLE

En somme, ce chapitre portait sur la détermination de l'effet de la concentration en pectinases et du temps de contact enzyme-purée sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation. Il en ressort que le traitement enzymatique de la purée entraînait une diminution de plus de 91% de la viscosité du jus de goyave à chair blanche à partir de la troisième minute de traitement. L'augmentation de la teneur en acide galacturonique

a permis de confirmer celle du taux d'hydrolyse de la pectine. La désintégration du réseau macromoléculaire de la purée de goyave à chair blanche a entraîné des modifications plus ou moins remarquables des caractéristiques physicochimiques du jus. Les caractéristiques telles que le pH, les teneurs en protéines et polyphénols diminuaient considérablement au cours du traitement ; tandis que d'autres tels que la conductivité et la couleur augmentaient. Cependant, le traitement enzymatique n'avait pas un effet considérable sur la capacité antioxydante des échantillons. Les conditions optimales de dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche sont : 0,078% - 0,100% m/m et 40 – 90 min pour la concentration en enzyme et le temps de contact enzyme-purée, respectivement. Les images des extraits séchés des échantillons ont permis de mettre en évidence la désintégration des particules et la liquéfaction du mélange au cours du traitement enzymatique. La dépectinisation a conduit à une dispersion des particules dans le jus et à l'amélioration de son homogénéité. Parmi les caractéristiques physicochimiques, seule la teneur en acide galacturonique dépendait de la concentration en enzyme et du temps de contact enzyme-purée. L'hypothèse formulée dans le cadre de ce chapitre n'était vérifiée que pour cette caractéristique.

Le traitement enzymatique conduit à une modification des paramètres physicochimiques et rhéologiques des jus de goyave. Quelles que soient les conditions de dépectinisation, le jus dépectinisé de goyave présente encore des particules qui peuvent subir des phénomènes d'agrégation et sédimenter au cours du stockage. De plus, les produits issus de la dépectinisation du jus de goyave à chair blanche peuvent être impliqués dans plusieurs types d'interaction affectant sa présentation au cours du stockage. Pour pallier au phénomène d'apparition de trouble dans le jus de goyave à chair blanche et diminuer sa proportion en particules, il serait indispensable de procéder à sa clarification qui peut se faire par centrifugation.

CHAPITRE 4

CLARIFICATION DU JUS DE GOYAVE À CHAIR

BLANCHE PAR UNE CENTRIFUGEUSE DE

LABORATOIRE A ROTOR CONIQUE ET

CARACTERISATION D'UNE CENTRIFUGEUSE-

DECANTEUSE CONTINUE ASSIETTES

CHAPITRE 4 : CLARIFICATION DU JUS DE GOYAVE À CHAIR BLANCHE PAR UNE CENTRIFUGEUSE DE LABORATOIRE A ROTOR CONIQUE ET CARACTERISATION D'UNE CENTRIFUGEUSE-DECANTEUSE CONTINUE A ASSIETTES

RESUME DU CHAPITRE

Ce chapitre a deux objectifs. Le premier est de déterminer l'effet du temps et de la vitesse de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche. Le deuxième est d'identifier les caractéristiques opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue à partir de la performance d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. A cet effet, le jus dépectinisé a été clarifié à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique respectivement à 1000, 2000, 3000, 4000 et 5000 rpm pendant respectivement 10, 20, 30 et 40 min. Le surnageant (jus) a été recueilli et son rendement déterminé. Ses caractéristiques physicochimiques ont été déterminées en fonction des conditions opératoires : les teneurs en protéines, en pectine, en acide galacturonique, en matière sèche, en sucres solubles totaux ; le pH ; la conductivité électrique et la limpidité. La surface des courbes de répartition granulométrique des particules du jus a également été déterminée. La performance de la centrifugeuse de laboratoire a été évaluée pour 1343g (3000 rpm), 2388g (4000 rpm) et 3731g (5000 rpm). Les granulométries maximales des particules ont été déterminées pour les échantillons centrifugés à 1343g. Pour cette vitesse, les débits d'alimentation correspondant des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes ont été déterminés pour des durées correspondantes d'opération de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique, de même que les seuils de coupure. Il en ressort que pour des vitesses de centrifugation supérieures à 597g (2000 rpm), la centrifugation a permis d'obtenir plus de $96 \pm 2\%$ m/m de jus. La centrifugation a contribué à une diminution considérable des teneurs en protéine et en pectine, de la largeur du spectre granulométrique des particules. Par contre, elle a contribué à une augmentation de la limpidité, de la teneur en sucres solubles totaux, mais elle n'a pas d'effets considérables sur la teneur en acide galacturonique et le pH. Des taux de clarification différents de moins de 10% ont été obtenus à 1343g (excepté à 10 min), 2388g et 3731g. Les limites de séparation pour des échantillons de 1343g sont 2669, 2200 et 1783 nm, correspondant à 20, 30 et 40 min respectivement. Les seuils de coupure (x_{50}) à 1343g pour les centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes sont **1887, 1556, 1261 nm**, correspondant à 20, 30 et 40 min, respectivement.

4.1 INTRODUCTION

Au cours du stockage, le jus dépectinisé de goyave à chair blanche peut être le siège d'autres types d'interactions moléculaires pouvant aboutir à la formation des particules contribuant à l'aspect trouble du jus. Parmi ces interactions figurent celles aboutissant à la formation de tannins. Ceux-ci sont des composés polyphénoliques servant de ponts et de liants pour agglomérer les molécules de protéines. Les complexes tanniques résultent de la polymérisation des composés phénoliques en des unités plus volumineuses. Les ions métalliques peuvent également contribuer à la formation de trouble (McLellan et Padilla-Zakour, 2005). Les produits de l'hydrolyse de la pectine peuvent former des agrégats avec les molécules de protéines ou de polyphénols aboutissant à la formation des particules (Shomer *et al.*, 1999). Les particules présentes dans le jus de goyave à chair blanche peuvent également être celles qui n'ont pas été hydrolysées au cours de la dépectinisation ou les cellules caillouteuses ou scléroïdes affectant la sensation gustative du jus de goyave à chair blanche (Wu *et al.*, 2005).

Le jus dépectinisé de goyave à chair blanche doit être clarifié afin de prévenir et limiter l'apparition de trouble au cours du stockage. Cette clarification peut se faire par centrifugation. Plusieurs travaux de centrifugation du jus de goyave à chair blanche sont présents dans la bibliographie. Kaur *et al.* (2009 et 2011), Surajbhan *et al.* (2012), et Marcelin *et al.* (2017) ont déterminé le rendement de jus de goyave à chair blanche et ses caractéristiques physicochimiques après centrifugation à des conditions opératoires fixes de vitesse de centrifugation et de temps. L'effet du temps et de l'accélération centrifuge sur ces caractéristiques n'a donc pas suffisamment été étudié. De plus, la performance de séparation des différentes centrifugeuses de laboratoire utilisées n'a pas été déterminée dans ces différents travaux. Enfin, l'étude des caractéristiques

dimensionnelles et opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue en fonction de la performance de clarification du jus de goyave à chair blanche de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique n'a pas été faite. Ce chapitre se décline en deux objectifs :

- Déterminer l'effet du temps et de la vitesse de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche avec pour hypothèse : les paramètres physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche dépendent des conditions de centrifugation ;

- Identifier les caractéristiques opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue à partir de la performance d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique avec pour hypothèse : le taux de clarification du jus de goyave à chair blanche d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique fixe les limites de fonctionnement d'une centrifugeuse-décanteuse continue.

4.2 MATERIEL ET METHODES

4.2.1 Matériel biologique

Le matériel utilisé pour les travaux décrits dans ce chapitre a été la goyave à chair blanche acquise chez le commerçant de fruit ci-dessus mentionné (Chapitre 2) dans le marché de l'Institut Indien de Technologie de Kharagpur.

4.2.2 Méthodes

4.2.2.1 Préparation du jus de goyave à chair blanche pour la clarification

Le jus de goyave à chair blanche a subi le traitement enzymatique comme décrit dans les chapitres précédents. Les conditions opératoires étaient les suivantes : concentration en enzyme :

0,078% m/m, Temps de contact enzyme-substrat : 40 minutes et température : $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Ces conditions ont été obtenues à partir de la plage optimale des paramètres. A l'issue du traitement enzymatique, le jus de goyave à chair blanche a été introduit dans des béchers de 1 litre et incubé dans un bain-marie bouillant (95°C) pendant 10 minutes pour arrêter la réaction enzymatique. Le contenu du bécher a été refroidi dans un bain-marie à la température ambiante. Le jus de goyave à chair blanche a été essoré à l'aide d'une toile filtrante et le filtrat recueilli et conditionné dans des bouteilles en polyéthylène téréphtalate (PET) et conservé dans le congélateur pour la suite des travaux.

4.2.2.2 Clarification du jus de goyave à chair blanche par centrifugation

Pour la centrifugation, 100 g de jus de goyave à chair blanche à la température ambiante ont été pesés dans des tubes de centrifugation d'une capacité de 250 mL. Les tubes ont été introduits dans le rotor d'une centrifugeuse (Remi, R – 236M, Remi Elektrotechnik Ltd, Bengale Occidentale, Inde). La centrifugation a été faite à la température ambiante ($35 \pm 3^\circ\text{C}$). La centrifugation du jus s'est faite en variant les paramètres de centrifugation. Les vitesses de centrifugation utilisées étaient 1000, 2000, 3000, 4000 et 5000 rpm. Les durées de centrifugation à vitesse constante étaient de 10, 20, 30 et 40 min. A l'issue de la centrifugation, le surnageant a été collecté et pesé dans des bocal en plastique PET préalablement tarées. Ceci a permis de déterminer le rendement de jus de goyave. Le culot a été détruit. Le surnageant a été conservé dans le réfrigérateur pour des analyses ultérieures.

4.2.2.3 Détermination des paramètres de procédés et des caractéristiques physicochimiques du jus de goyave

4.2.2.3.1 Détermination du rendement

Le rendement d'extraction du jus de goyave à chair blanche a été déterminé à l'aide de l'Equation 20 :

$$\eta = \frac{m_s}{m_i} \times 100 \quad \text{Équation 20}$$

Avec η : le rendement en jus de goyave à chair blanche (%); m_s et m_i les masses de surnageant et de jus de goyave à chair blanche initial (g), respectivement.

Le rendement a été déterminé en fonction de la Force Centrifuge Relative. Elle exprime l'équivalent en g de la vitesse de rotation et permet de la comparer à l'accélération de la pesanteur. Elle représente la valeur maximale de champ de forces centrifuges à laquelle sont soumises les particules plaquées contre la paroi interne du tube de centrifugation. Elle est issue des opérations effectuées à partir de l'expression du rapport entre l'accélération centrifuge et l'accélération de la pesanteur. La Force Centrifuge Relative (FCR) a été déterminée grâce à l'Equation 21 (Thermo Fischer Scientific, 2009) :

$$FCR(g) = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times N^2 \quad \text{Équation 21}$$

Avec FCR : la Force Centrifuge Relative (g); N : la vitesse de rotation (rpm); r : la distance radiale maximale de sédimentation des particules à partir de l'axe de rotation (cm).

4.2.2.3.2 Analyse granulométrique des particules des échantillons de jus

La détermination de la granulométrie des particules du surnageant a été faite en utilisant le Zetasizer basé sur le principe de la diffusion dynamique de la lumière (Malvern, Zetasizer nano, Malvern Instruments limited, Royaume-Uni). A cet effet, le milieu dispersant utilisé était l'eau déminéralisée et la mesure a été faite à 25°C. Dans le cas de l'échantillon de jus de goyave à chair blanche avant centrifugation, la granulométrie des particules a été mesurée à l'aide du Mastersizer (Mastersizer 2000 E Version 5.20, Numéro série MAL1017204, Malvern Instruments Limited, Royaume Uni). La répartition granulométrique des particules a été générée et la valeur moyenne de la granulométrie de particule a été déterminée grâce au logiciel intégré à l'instrumentation. Les différentes courbes de répartition granulométrique de particule des échantillons centrifugés ont subi un ajustement à l'aide du modèle de type log normal, afin de déterminer la relation entre la fréquence (%) et la granulométrie particules (nm). Le logiciel Minitab 11.0 a été utilisé à cet effet et une analyse de variance a été faite grâce à ce logiciel afin de déterminer les seuils de signification des paramètres. Pour chaque condition opératoire (vitesse - temps de centrifugation), une équation du modèle a été générée (Equation 22).

$$y = \frac{a}{x} \times e^{-\left[-0,5 \left(\frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{b} \right)^2 \right]} \quad \text{Équation 22}$$

Avec x : la granulométrie des particules (en nm) ; y : la fréquence (en %). Les constantes a et b sont les constantes du modèles, x_0 est la moyenne géométrique des granulométries.

Pour chaque condition opératoire, les paramètres a , b et x_0 ont été estimés grâce au logiciel Minitab 11.0 et les coefficients de détermination ont été déterminés. La surface de la courbe décrite

par le modèle de type log normal a été déterminée en calculant l'intégrale de cette fonction entre deux valeurs données de granulométrie de particule. L'unité de surface a été exprimée en pourcentage*nanomètre (%*nm). Cette détermination de la surface a été faite en utilisant le logiciel Scientific Work Place version 5.5. La granulométrie moyenne des particules et la surface des courbes ont été tracées en fonction du temps pour chaque vitesse de centrifugation.

4.2.2.3.3 Détermination de la teneur en matière sèche.

La détermination de la teneur en matière sèche a été faite de la manière suivante. Une boîte de pétri propre a été initialement pesée et la masse à vide notée (M_0). Une masse de jus de goyave à chair blanche (5 g) a été pesée et la masse totale constitue la masse initiale avant séchage (M_1). La boîte de pétri a été introduite dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. A l'issue du séchage, les boîtes de pétri ont été retirées de l'étuve et mises dans un dessiccateur pour le refroidissement à la température ambiante. La masse de la boîte de pétri a été déterminée par pesée et constituait la masse totale après séchage (M_2). La teneur en matière sèche a été déterminée à l'aide de l'Equation 23 :

$$MS(\%) = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

Équation 23

4.2.2.3.4 Détermination des autres caractéristiques

Les caractéristiques physicochimiques suivantes ont été déterminées tel que mentionné dans les deux précédents chapitres : les teneurs en sucres solubles totaux (TSS), en acide galacturonique, en pectine, en protéines ; le pH et la conductivité électrique.

La limpidité des échantillons de jus de goyave à chair blanche a été déterminée en mesurant leur transmittance à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (M/s Perkin Elmer, Connecticut, USA) contre l'eau déminéralisée servant de blanc.

4.2.2.4 Détermination des caractéristiques dimensionnelles et opérationnelles d'une centrifugeuse continue

L'objectif a été de déterminer les caractéristiques dimensionnelles et le débit d'alimentation d'une centrifugeuse continue à partir de la performance de la centrifugeuse de laboratoire. L'objectif technologique recherché étant centré sur le surnageant (jus de goyave), la décantation centrifuge a été préférée à l'essorage centrifuge (Towler et Sinnott, 2008 ; Koller, 2009). Le bol de la centrifugeuse de laboratoire utilisé est de type conique (tronc de cône) à angle fixe. Le type de centrifugeuse-décanteuse continue choisi dans cette étude est la centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes. Ce choix est justifié par la similitude géométrique entre le bol de la centrifugeuse de laboratoire et un disque de la centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes (Figure 40). Le bol et le disque ont tous la forme d'un cône tronqué lorsqu'ils sont placés sur une surface plane et horizontale. Cette similitude géométrique conduit à une similarité de l'écoulement des particules dans le tube de centrifugation et entre deux disques consécutifs.

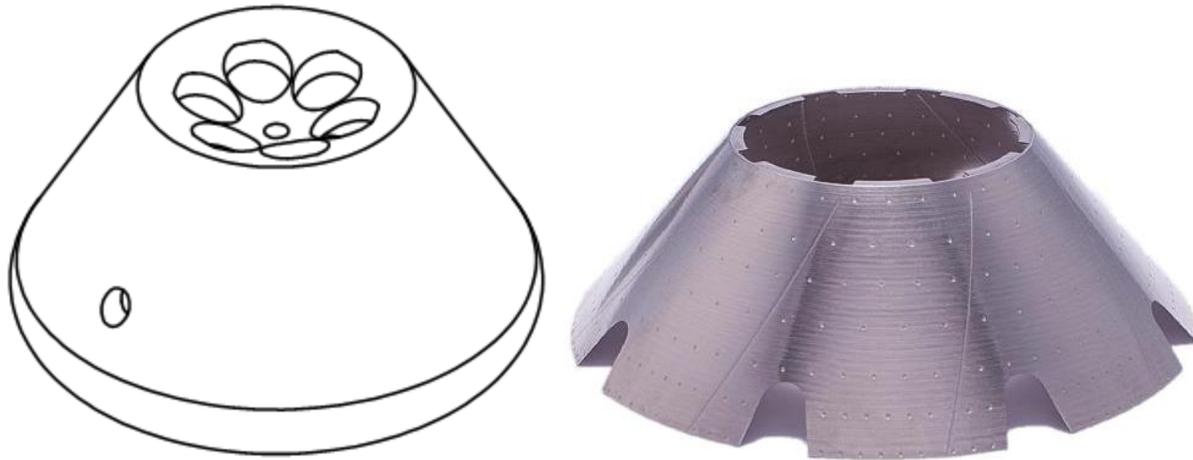


Figure 40 : Représentation tridimensionnelle (A) du rotor de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique et (B) d'un disque d'une centrifugeuse à assiettes (Alpha Laval)

La détermination des caractéristiques dimensionnelles et opérationnelles des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes a été faite en suivant l'approche décrite par Maybury et al. (2000). Ils ont fait une étude comparative de la performance de clarification d'une centrifugeuse de laboratoire et d'une centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes. Cette étude visait à établir une relation mathématique entre la performance de clarification de ces centrifugeuses. Elle avait pour finalité la détermination des débits d'alimentation d'une centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes à partir de la performance de la centrifugeuse de laboratoire. A cet effet, la détermination des facteurs sigma de la centrifugeuse de laboratoire a été nécessaire. La connaissance des facteurs sigma a permis d'estimer le taux de clarification qui a été déterminé en fonction de la capacité du séparateur. Le débit d'alimentation des centrifugeuses-décanteuses continues ayant des caractéristiques dimensionnelles données a été déterminé en fonction des conditions opératoires de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. Pour celles-ci, le seuil de coupure ou la granulométrie équiprobable des particules en suspension a été estimé. Cette estimation a nécessité la détermination de la limite de séparation ou granulométrie maximale

(diamètre maximal de particule pouvant se trouver dans le jus de goyave à chair blanche après centrifugation).

4.2.2.4.1 Détermination des caractéristiques de fonctionnement de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique

La centrifugeuse utilisée dans cette étude était une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique réfrigérée et programmable (Remi, R – 236M, Remi Elektrotechnik Ltd, Bengale Occidentale, Inde). Elle était munie d'un bol (rotor) en tronc de cône, en acier inoxydable dont le modèle est R – 236M (Figure 41) à angle fixe et disposant de six (6) creux pouvant prendre 6 tubes de centrifugation. L'angle d'inclinaison des tubes était de 20° par rapport à l'axe vertical.



(A)

(B)

Figure 41: Image du rotor R – 236M (A) et de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique (B)

Les caractéristiques dimensionnelles du rotor sont consignées dans le Tableau 7.

Tableau 7: Caractéristiques géométriques du rotor R – 236 M

Caractéristiques	Rayon minimal (mm)	Rayon minimal d'étude (mm)	Rayon maximal (mm)	Rayon moyen (mm)	Angle d'inclinaison par rapport à la verticale (°)
Valeurs	≈30	≈54	133,5	≈82	20

La détermination de la performance de clarification de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique a nécessité la détermination de son facteur sigma (Σ) ou aire équivalente théorique. Celui-ci représente la surface d'un bassin de sédimentation gravitaire capable d'effectuer la séparation avec une performance similaire à celle de la centrifugeuse pour le même débit d'alimentation de la suspension (Svarovsky, 2000). Cette détermination s'est faite en exploitant les travaux de Rayat et al. (2016). Dans le cadre de l'étude de la performance de séparation d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique et d'une centrifugeuse continue à assiettes suivant des conditions opératoires similaires, ces chercheurs ont donné l'expression mathématique permettant de déterminer le facteur sigma d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. En considérant les temps d'accélération et de décélération négligeables par rapport au temps de consigne, le facteur sigma de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique a pu être obtenu grâce à l'Equation 24. Celle-ci a été générée en supposant la présence d'une suspension essentiellement constituée de la particule correspondant au seuil de coupure (x_{50}). La proportion de cette particule dans le surnageant est égale à celle dans le culot. Pour le calcul de cette aire, il a été supposé un régime de chute des particules de type laminaire. Les phénomènes de transfert de masse lors de la centrifugation ont été négligés.

$$\Sigma_1 = \frac{V_1 \times \omega^2}{6 \times g \times \ln\left(\frac{2R_2}{R_1 + R_2}\right)} = \frac{V_1 \times (2\pi N)^2}{3600 \times 6 \times g \times \ln\left(\frac{2R_2}{R_1 + R_2}\right)} \quad \text{Équation 24}$$

Avec Σ_1 : le facteur sigma de la centrifugeuse (m^2) ; g : l'accélération de la pesanteur ($m.s^{-2}$) ; ω : la vitesse angulaire ($rad.s^{-1}$) ; N : la vitesse de rotation (rpm) ; V_1 : Volume de l'alimentation (m^3) ; R_1 et R_2 les distances radiales minimale et maximale de sédimentation par rapport à l'axe du rotor (m), respectivement.

Le facteur sigma a été déterminé pour les vitesses 3000, 4000 et 5000 rpm.

4.2.2.4.2 Détermination de la performance de séparation de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique

Cette détermination a nécessité celle du taux de clarification. Pour cela, la procédure suivie est celle décrite par Maybury et al. (2000) avec quelques modifications. La densité optique de chaque échantillon (alimentation et échantillon clarifié) a été déterminée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (M/s Perkin Elmer, Connecticut, USA) contre l'eau déminéralisée servant de blanc. Pour la détermination du taux de clarification, l'échantillon centrifugé ayant la densité optique minimale a été utilisé comme celui de contrôle. La détermination du taux de clarification a été faite grâce à l'Equation 25.

$$TC(\%) = \left[1 - \left(\frac{DO_{éch} - DO_{contrôle}}{DO_{ali} - DO_{contrôle}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Équation 25}$$

Avec : TC : le taux de clarification (%) ; $DO_{éch}$, DO_{ali} et $DO_{contrôle}$ les densités optiques de l'échantillon, de l'alimentation et de l'échantillon de contrôle, respectivement.

Pour les vitesses de centrifugation 3000, 4000 et 5000 rpm, le taux de clarification a été déterminé en fonction de la capacité du séparateur ($V_I/t/\lambda_{lab}\Sigma_{lab}$). V_I est le volume de l'échantillon traité (en m^3); λ_{lab} est le facteur de correction pour caractériser la déviation du régime d'écoulement des particules par rapport au régime idéal dans le cas de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique, Σ_{lab} son aire équivalente théorique (en m^2) correspondant à la vitesse de centrifugation et t le temps de centrifugation (temps de consigne) (en s). Le temps de consigne a été utilisé pour la détermination de la capacité du séparateur, les temps d'accélération et de décélération ayant été négligés. Pour les centrifugeuses de laboratoire à rotor conique, λ_{lab} est le plus souvent assimilé à 1 (Maybury *et al.*, 2000 ; Boychyn *et al.*, 2004). La densité optique de l'échantillon d'alimentation a été assimilée à 2 au regard de la limite de détection du spectrophotomètre UV-Visible.

4.2.2.4.3 Détermination de la granulométrie maximale de particule (x_{max})

La vitesse de centrifugation utilisée à cet effet est 3000 rpm. Ce choix a été guidé par les variations significatives des paramètres observées à cette vitesse par rapport aux vitesses inférieures et les variations négligeables par rapport aux vitesses supérieures (4000 et 5000 rpm).

La détermination préalable de la granulométrie maximale de particule pouvant se trouver dans le jus de goyave à chair blanche après centrifugation a également été nécessaire. Cette détermination a nécessité la détermination du "grade efficiency" qui est la probabilité pour des particules de granulométrie donnée d'être éliminées par centrifugation, si la suspension initiale n'était constituée exclusivement que d'elles. La détermination de cette probabilité a exigé l'utilisation de la courbe de répartition granulométrique de particules du jus brut et du jus clarifié de goyave à chair blanche. Les échantillons de jus clarifié de goyave à chair blanche utilisés à cet effet ont été ceux centrifugés à 3000 rpm pendant 20, 30 et 40 min. Pour chaque granulométrie de

particule, le "grade efficiency" a été déterminé grâce aux fréquences correspondantes pour le jus brut et le jus centrifugé, ainsi que du rendement en jus obtenu grâce à ces paramètres. Il a été déterminé pour une granulométrie donnée de particule à l'aide de l'Equation 26 :

$$G_t(x) = 1 - (1 - E_{T_t}) \times \frac{dF_{f_t}(x)}{dF(x)} \quad \text{Équation 26}$$

Avec $G_t(x)$: le "grade efficiency" correspondant à la particule de granulométrie x ; $dF_{f_t}(x)$ et $dF(x)$: la fréquence de la particule de granulométrie x dans le jus de goyave à chair blanche centrifugé et brut, respectivement ; E_{T_t} : le rendement en jus de goyave à chair blanche centrifugé à 3000 rpm pendant un temps t en min.

Les valeurs de G ont été tracées en fonction de la granulométrie des particules. La granulométrie de particule au-delà de laquelle la valeur de G est égale à 1 est la granulométrie maximale ou limite de séparation (x_{max}). Cette particule est celle ayant la probabilité la plus élevée de se retrouver dans le jus centrifugé.

4.2.2.4.4 Détermination des caractéristiques dimensionnelles et opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue pour la clarification du jus de goyave à chair blanche

Les caractéristiques intrinsèques d'une centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes ont permis de déterminer son facteur sigma. Grâce à ce facteur et la performance de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique, le débit d'alimentation de la centrifugeuse continue a été déterminé. Celle-ci décrirait une performance de séparation similaire à celle de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique utilisée dans cette étude. La similarité de performance est traduite par une égalité de taux de clarification de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique et de la centrifugeuse-

décanteuse continue à assiettes telle que décrite par les travaux de Maybury et al. (2000) et Rayat et al. (2016). L'Equation 27 est la résultante de cette égalité de taux de clarification.

$$\frac{V}{t \sum_{lab} \lambda_{lab}} = \frac{Q}{\sum_{ds} \lambda_{ds}} \quad \text{Équation 27}$$

Avec Q , Σ_{ds} et λ_{ds} , le débit d'alimentation (en $m^3.s^{-1}$), le facteur sigma (en m^2) et le facteur de correction d'une déviation du régime d'écoulement par rapport au régime idéal de la centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes ; et V_1 , t , Σ_{lab} et λ_{lab} , le volume du jus de goyave à chair blanche à centrifuger (en m^3), le temps (en s), le facteur sigma (en m^2) et le facteur de correction d'une déviation du régime d'écoulement par rapport au régime idéal de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique, respectivement.

Le facteur λ pour la majorité des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes est égal à 0,4 (Maybury *et al.*, 2000 ; Boychyn *et al.*, 2004).

A partir de l'Equation 27, le débit d'alimentation de la centrifugeuse à assiettes a été déduit (Equation 28).

$$Q = \frac{V}{t \sum_{lab} \lambda_{lab}} \sum_{ds} \lambda_{ds} \quad \text{Équation 28}$$

Un certain nombre de centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes ont été recensées dans la bibliographie. Leur facteur sigma a été déterminé à partir de leurs spécifications. Cette détermination s'est faite grâce à l'Equation 29 pour une FCR équivalente à 3000 rpm en supposant que leur débit-volume est maximal (q_{Vmax}).

$$\Sigma = \frac{2}{3} \times \frac{\omega^2}{g} \times N \times \frac{\pi \times (r_2^3 - r_1^3)}{\tan \theta} \times F_L \quad \text{Équation 29}$$

Avec Σ : le facteur sigma de la centrifugeuse (m^2) ; θ : l'angle d'inclinaison des disques par rapport à la verticale ($^\circ$) ; g : l'accélération de la pesanteur ($m.s^{-2}$) ; ω : la vitesse angulaire ($rad.s^{-1}$) ; N : le nombre de disques ; F_L : le facteur de correction des butées sur les assiettes ; r_1 et r_2 les rayons intérieur et extérieur des disques (m), respectivement.

Lorsque les caractéristiques des assiettes étaient disponibles dans les différents travaux recensés, le facteur F_L avait été déterminé grâce à l'Equation 30 ; dans le cas contraire, il était assimilé à 1.

$$F_L = 1 - \left(\frac{3Z_L B_L}{4\pi r_2} \right) \left(\frac{1 - (r_1/r_2)^2}{1 - (r_1/r_2)^3} \right) \quad \text{Équation 30}$$

Avec : Z_L le nombre de butées sur chaque assiette de la centrifugeuse ; B_L : la hauteur d'une butée (m).

Le Tableau 8 présente les caractéristiques de certaines centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes ayant fait l'objet d'une étude et dont les caractéristiques ont permis de déterminer leur facteur sigma.

Tableau 8 : Caractéristiques des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes commerciales recensées dans la bibliographie

Modèles	Constructeurs	r_{min}, r_{max} (mm)	N	Z	B (m)	θ (°)	Sources
Westfalia	Westfalia Separator AG	21 ; 53	62	6	0,005	45	Boychyn <i>et al.</i> , 2004
SAOOH	(Oelde, Allemagne)						
GEA OTC	Westfalia Separator	22 ; 44	36		0,0025	40	Cambiella <i>et al.</i> , 2006
2-03-107	Systems GmbH						
SC6-06-076	Westfalia Separator (Oelde, Allemagne)	31 ; 62	76		0,0005	40	Chlup <i>et al.</i> , 2008
Westfalia	Westfalia Separator	26 ; 55	45			38,5	Espuny Garcia del Real, 2016
CSA-1	GmbH (Oelde, Allemagne)						
Frau CN2S	Frau (Italie)	15 ; 54,5	51			52	Jukkola <i>et al.</i> , 2018
Culturefuge	Alfa Laval AB	36 ; 84,5	82	8	0,004	40	Shekhawat <i>et al.</i> , 2018
100™	(Lund, Suède)						

Le facteur sigma des différentes centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes a permis de calculer les conditions opératoires correspondant à celles de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. Il s'est agi de déterminer le débit d'alimentation de chacune des centrifugeuses pour un fonctionnement à une FCR équivalente à 3000 rpm pendant 20, 30 et 40 min, respectivement.

La centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes qui a été sélectionnée est celle qui a le débit d'alimentation du jus de goyave à chair blanche le plus élevé pour un temps donné de fonctionnement de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique.

4.2.2.4.5 Détermination du seuil de coupure (x_{50}) correspondant à la centrifugeuse à assiettes

La granulométrie maximale a permis de déterminer le seuil de coupure (x_{50}). Cette détermination a été faite en traçant la courbe de "*grade efficiency*" ou de la probabilité théorique en fonction de la granulométrie des particules comprise entre la granulométrie minimale décrite dans la série et x_{max} . Cette probabilité théorique pour chacune des granulométries de particule a été déterminée à l'aide de l'Equation 31. Cette équation est celle correspondant aux centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes (Svarosky, 2000). Le seuil de coupure (x_{50}) est la granulométrie de particule correspondant à la valeur de probabilité de 0,5. Cette granulométrie est indépendante de la suspension initiale.

$$G(x) = \left(\frac{x}{x_{max}} \right)^2 \quad \text{Équation 31}$$

Avec : $G(x)$: la probabilité correspondant aux particules de granulométrie x (nm) ; x_{max} : la granulométrie maximale de particule ayant la probabilité la plus élevée (nm).

La courbe de la probabilité théorique en fonction de la granulométrie de particule a été tracée pour 20, 30 et 40 min à 3000 rpm. La détermination du seuil de coupure (x_{50}) a été faite par projection graphique de la droite correspondant à la probabilité 0,5 sur l'axe des granulométries de particules. La granulométrie ainsi obtenue correspond à x_{50} .

4.3 RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1 Effet des paramètres de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave

4.3.1.1 Effet des paramètres de centrifugation sur le rendement d'extraction du jus de goyave

La centrifugation a permis d'obtenir le jus de goyave à chair blanche à une proportion comprise entre $89,72 \pm 0,69$ et $97,07 \pm 0,69\%$ m/m (Figure 42). Le rendement d'extraction du jus est pratiquement supérieur à 90% pour l'ensemble des combinaisons de paramètres appliquées. Les rendements en jus obtenus pour une vitesse de centrifugation de 149g (1000 rpm) sont de l'ordre de 90% ($91 \pm 2\%$ m/m). Avec cette vitesse, la proportion maximale de jus de goyave à chair blanche pouvant être obtenue dans les conditions de temps employées est de 93% ; il faudrait de ce fait augmenter l'accélération centrifuge afin d'obtenir un rendement plus élevé.

Pour les accélérations centrifuges comprises entre 597g (2000 rpm) et 3731g (5000 rpm), les rendements d'extraction sont supérieurs à 95% (Figure 42). Pour celles-ci, l'augmentation de la FCR n'affecte pas significativement le rendement de jus de goyave, quel que soit le temps de centrifugation (Tableau 18 (Annexe 6)). Les valeurs de rendement de jus de goyave à chair blanche ont permis de conclure que la proportion maximale de culot dans le jus initial pour des valeurs de paramètres utilisés est de l'ordre de $2,5 \pm 0,5\%$.

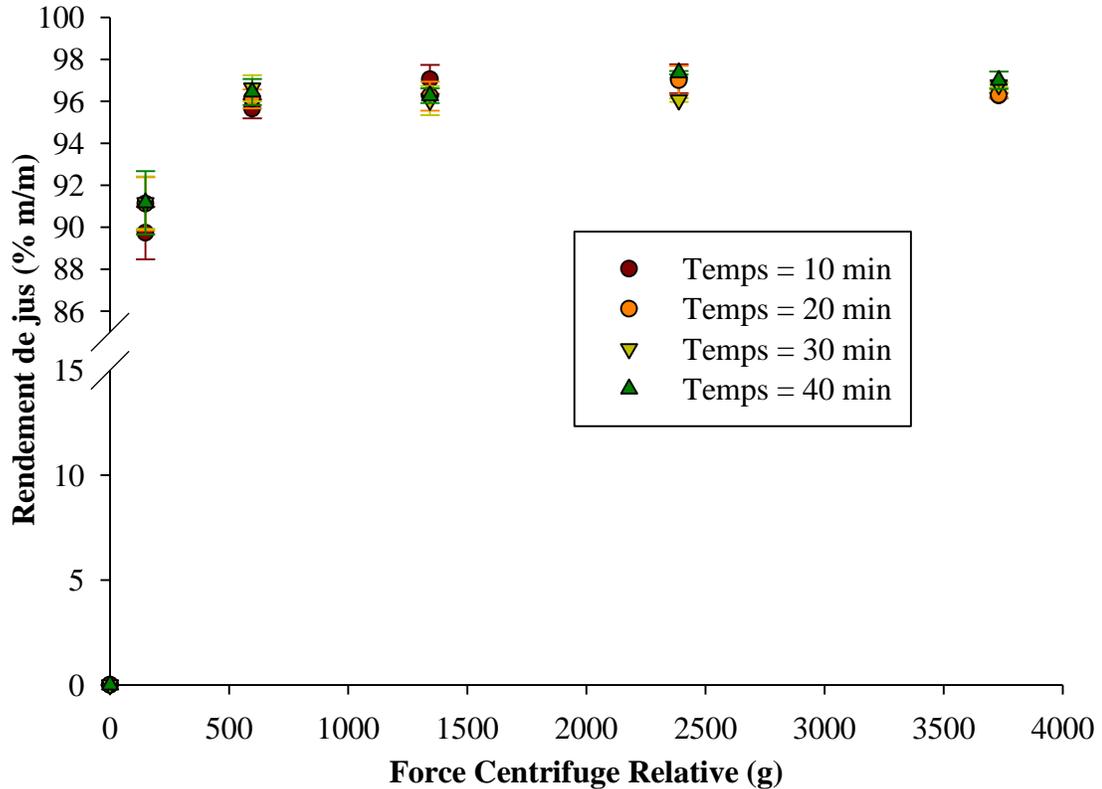


Figure 42 : Rendement en jus de goyave à chair blanche en fonction de la Force Centrifuge Relative appliquée

Au regard des valeurs ainsi obtenues, il apparaît que le rendement en jus de goyave à chair blanche devrait être couplé à d'autres caractéristiques afin d'apprécier et de déterminer l'effet des paramètres de centrifugation sur le jus clarifié de goyave à chair blanche.

4.3.1.2 Effet des paramètres de centrifugation sur la répartition granulométrique de particules du jus clarifié de goyave à chair blanche

La granulométrie moyenne des particules dans le jus de goyave à chair blanche initial (non centrifugé) est de 72 μm . La centrifugation contribue à une diminution considérable de la granulométrie moyenne des particules du jus clarifié de goyave à chair blanche ; celle-ci varie de 332 nm à 1140 nm (Figure 43).

Pour une accélération centrifuge donnée, l'augmentation du temps de centrifugation entraîne une réduction de la largeur du spectre granulométrique des particules (Figure 43). La centrifugation est une opération de séparation d'un mélange solide-liquide ou liquide-liquide basée sur la différence de masse volumique et qui consiste à soumettre le mélange à une accélération centrifuge. Le liquide ou les particules les plus denses se sédimentent et s'accumulent au niveau d'un front de sédimentation, constituant ainsi le culot. L'ordre de sédimentation est tributaire de celui de la masse volumique des particules ; celles ayant des masses volumiques les plus élevées se sédimentent en premier lieu. Le diamètre de la particule est un facteur qui affecte sa vitesse de sédimentation. Plus le diamètre d'une particule est élevé, plus sa vitesse de sédimentation l'est (Robatel et Borel, 1989*a*). La granulométrie de la particule serait liée à sa masse volumique. La réduction de la largeur du spectre granulométrique des particules en fonction du temps de centrifugation pourrait être expliquée par la vitesse de sédimentation de la particule. En effet, la composante radiale de la vitesse de sédimentation d'une particule, régie par la Loi de Stokes est fonction de la différence de masse volumique entre celle de la particule et celle du liquide, mais également du carré du diamètre de la particule (Svarovsky, 2000). Au cours de la centrifugation, les particules plus denses et plus grosses se sédimentent en premier lieu. Leur masse volumique étant très élevée par rapport à celle du liquide et leur diamètre étant grand, leur vitesse de sédimentation serait également élevée. Lorsque ces grosses particules se seraient sédimentées, le surnageant serait constitué de particules plus fines. L'augmentation du temps entraînerait la sédimentation des particules dans l'ordre décroissant de leur granulométrie, leur densité, et par conséquent de leur vitesse de sédimentation (le temps étant une composante de la vitesse). Cette diminution de granulométrie des particules entraînerait également une diminution du diamètre moyen de ces particules au cours du temps.

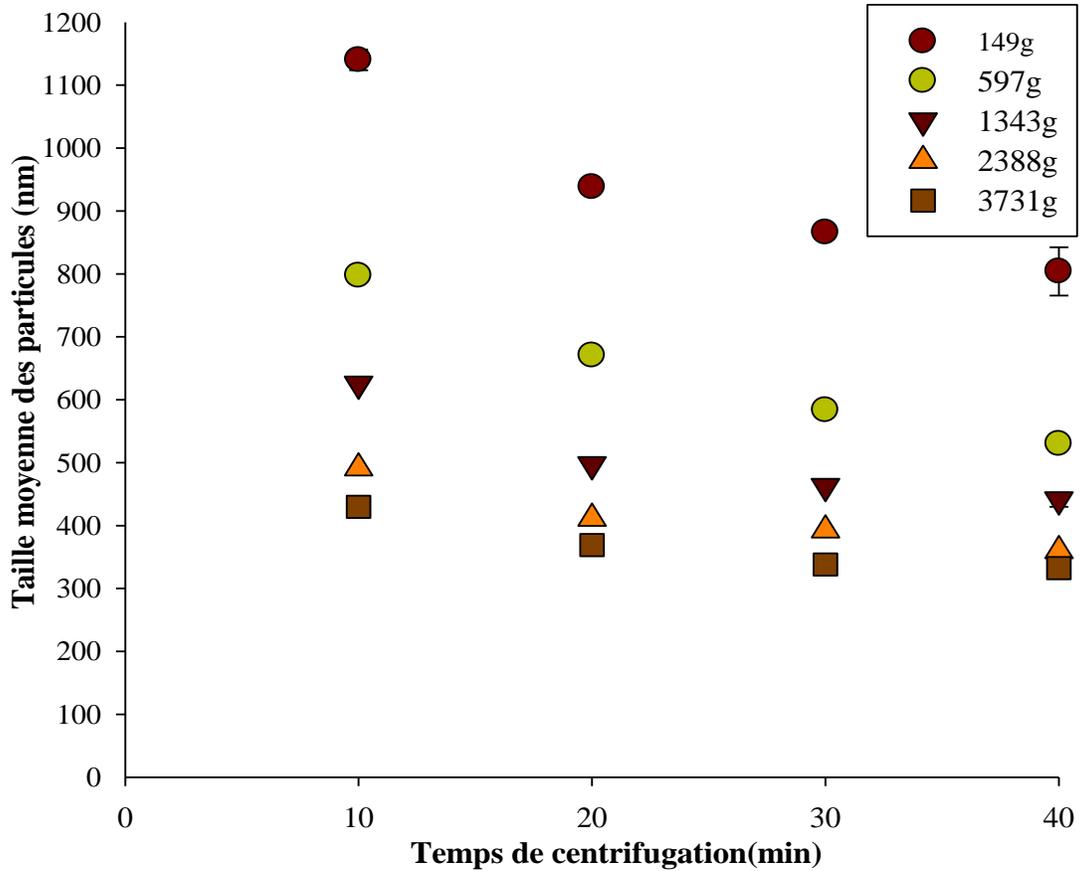


Figure 43: Granulométrie moyenne des particules des jus clarifiés en fonction des paramètres de centrifugation.

Pour une valeur précise du temps de centrifugation, l'augmentation de l'accélération centrifuge entraîne une réduction de la largeur du spectre granulométrique des particules (Figure 43). Cette tendance corrobore avec celle obtenue par Chawafambira et al. (2015). La réduction de la largeur du spectre granulométrique des particules avec l'augmentation de l'accélération centrifuge pourrait s'expliquer par le fait que l'augmentation de la vitesse entraîne une augmentation de l'accélération centrifuge. La vitesse de sédimentation d'une particule est directement proportionnelle à l'accélération centrifuge (Svarovsky, 2000). Pour des particules de granulométrie donnée, la différence entre leur masse volumique et celle du liquide étant constante, l'augmentation de l'accélération centrifuge entraînerait une sédimentation des particules ayant une

masse volumique élevée et un diamètre plus grand. La sédimentation de ces particules entrainerait la présence dans le surnageant des particules plus fines et moins denses. Avec l'augmentation de la force centrifuge, ces particules plus fines pourraient également sédimenter dans l'ordre décroissant de leur diamètre et de leur vitesse de sédimentation. La conséquence de cette sédimentation des particules dans l'ordre décroissant de leur granulométrie serait la diminution de leur proportion dans le surnageant et par ricochet de la granulométrie moyenne qu'elles décrivent.

Les différentes valeurs moyennes de granulométrie des particules sont obtenues par pondération des différentes valeurs de granulométrie. Pour visualiser la répartition des différentes granulométries autour de la valeur moyenne, une répartition granulométrique des particules des jus de goyave à chair blanche brut (Figure 44) et centrifugés suivant les conditions opératoires données (Figure 45) a été faite.

La répartition granulométrique des particules du jus brut de goyave à chair blanche présente deux pics, un premier autour de 2250 nm et un second autour de 90000 nm (Figure 44). Il apparaît que les particules dont la granulométrie est comprise entre 22440 et 251785 nm sont celles ayant la plus forte proportion au regard de la surface. Les particules dont la granulométrie est comprise dans cet intervalle représentent 72,77% des particules présentes dans le jus de goyave. La répartition granulométrique de particules a permis grâce au logiciel intégré à l'équipement de mesure (Mastersizer) de déterminer la granulométrie moyenne des particules ; elle est de 72138nm. Les particules de granulométrie supérieure à celle-ci représentent 45,45% de l'ensemble des particules. Il apparaît que le jus de goyave à chair blanche non centrifugé contient un large spectre de particules relativement grosses et des granulats. Ces particules et granulats pourraient résulter des effets des phénomènes d'interaction et d'agrégation des particules (Section 3.3.3.5)

avec formation des complexes volumineux ayant tendance à sédimenter au fond du récipient (Annexe 5) (Shomer *et al.*, 1999 ; McLellan et Padilla-Zakour, 2005).

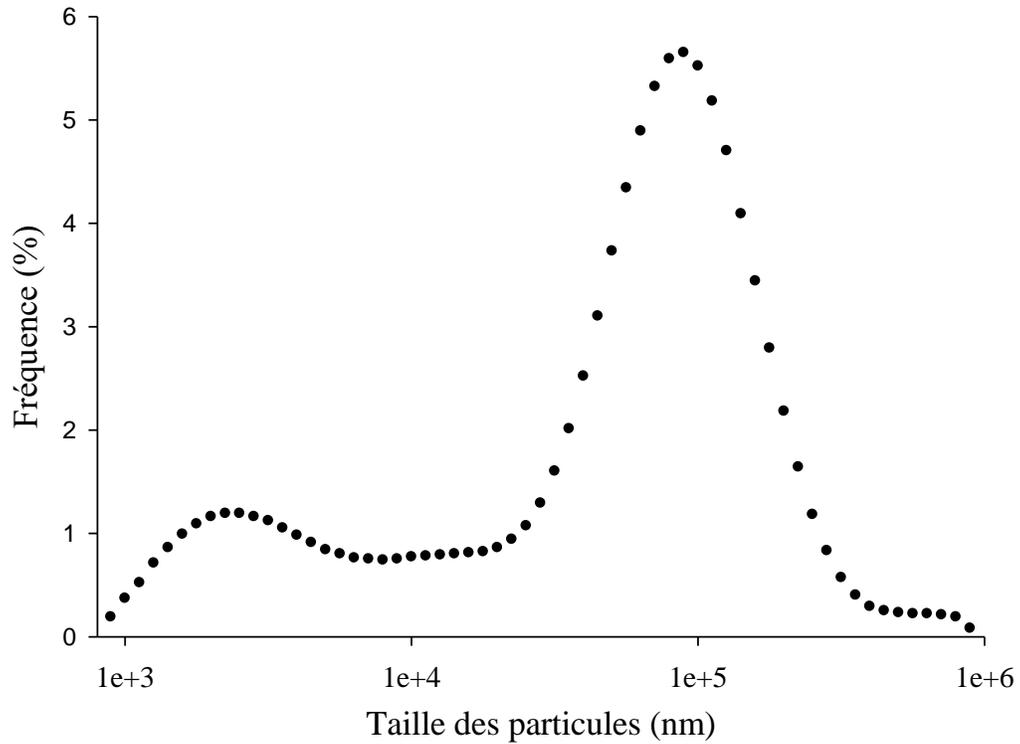
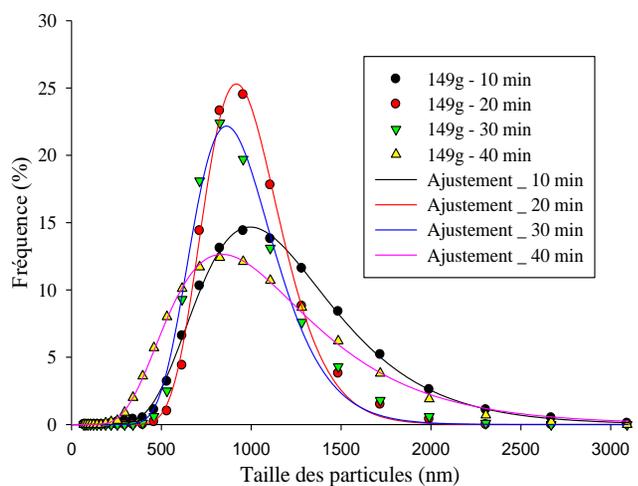
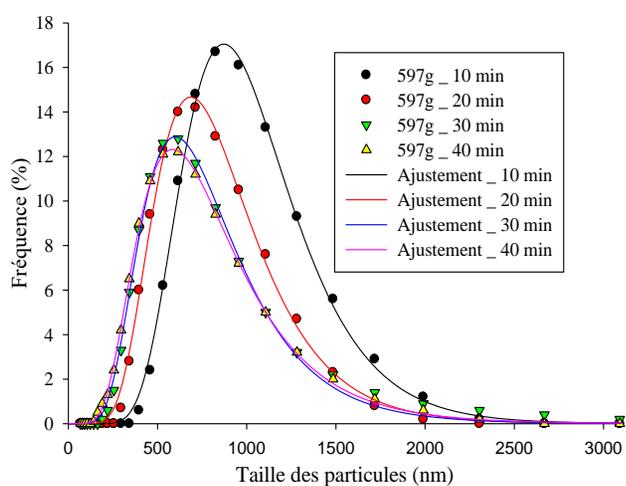


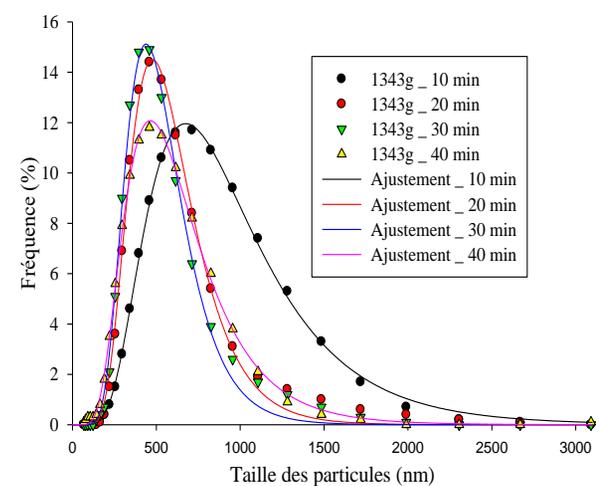
Figure 44: Répartition granulométrique des particules du jus brut de goyave à chair blanche (non centrifugé)



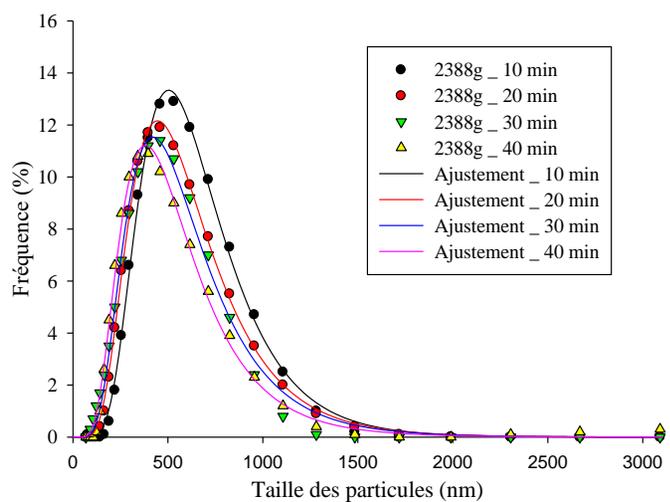
(a)



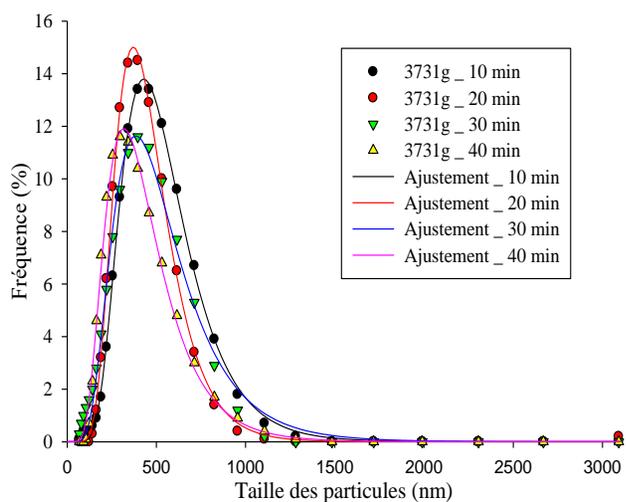
(b)



(c)



(d)



(e)

Figure 45: Répartition granulométrique des particules de jus clarifiés de goyave. (a), (b), (c), (d) et (e) jus de goyave à chair blanche centrifugés aux accélérations et temps de centrifugation indiqués.

Dans le cas des jus centrifugés de goyave à chair blanche, deux parties peuvent être distinguées sur la courbe unique de répartition granulométrique des particules : une partie ascendante avec une pente raide et une partie descendante présentant une concavité décroissante vers le bas (Figure 45). La distribution ne serait pas de type normal ou Gaussien, mais de type Fischer. Pour chaque force centrifuge, l'augmentation de la durée de centrifugation s'accompagne d'un resserrement progressif des courbes autour du diamètre moyen correspondant (Figure 45).

Les lignes continues sur chacune des courbes représentent les courbes d'ajustement générées par le logiciel SigmaPlot ; le modèle étant de type log normal (Equation 21). Les constantes du modèle pour les différentes conditions opératoires ont été déterminées et consignées dans le Tableau 9, de même que les valeurs du coefficient de détermination et de l'analyse des variances. Ces coefficients montrent que le modèle log normal pourrait être utilisé pour l'ajustement des courbes de répartition granulométrique des particules. Les surfaces des courbes pour toutes les conditions de centrifugation ont été obtenues en calculant l'intégrale des différentes fonctions entre 68 et 3091 nm ; ces surfaces ont été déterminées en fonction desdites conditions (Figure 46).

La centrifugation présente un effet remarquable pour les accélérations centrifuges de 597g et 1343g au regard du profil des courbes de répartition granulométrique des particules (Figure 46). Pour ces accélérations, l'augmentation de la durée de centrifugation entraîne une diminution considérable de la surface des courbes au cours des dix premières minutes. Au-delà de 20 min de centrifugation, les surfaces des courbes diminuent de manière quasi linéaire avec une pente plus faible. L'augmentation du temps de centrifugation entraîne une diminution non considérable de la surface totale de la courbe de répartition granulométrique des particules. Ceci est en accordance avec la tendance observée sur la courbe de diminution de la granulométrie moyenne de particules

pour ces deux accélérations centrifuges (Figure 43). La courbe des surfaces décrit une tendance quasi linéaire pour les accélérations centrifuges de 149g, 2388g et 3731g. Pour celles-ci, l'augmentation du temps de centrifugation entraîne une diminution non considérable de la surface totale de la courbe de répartition granulométrique des particules.

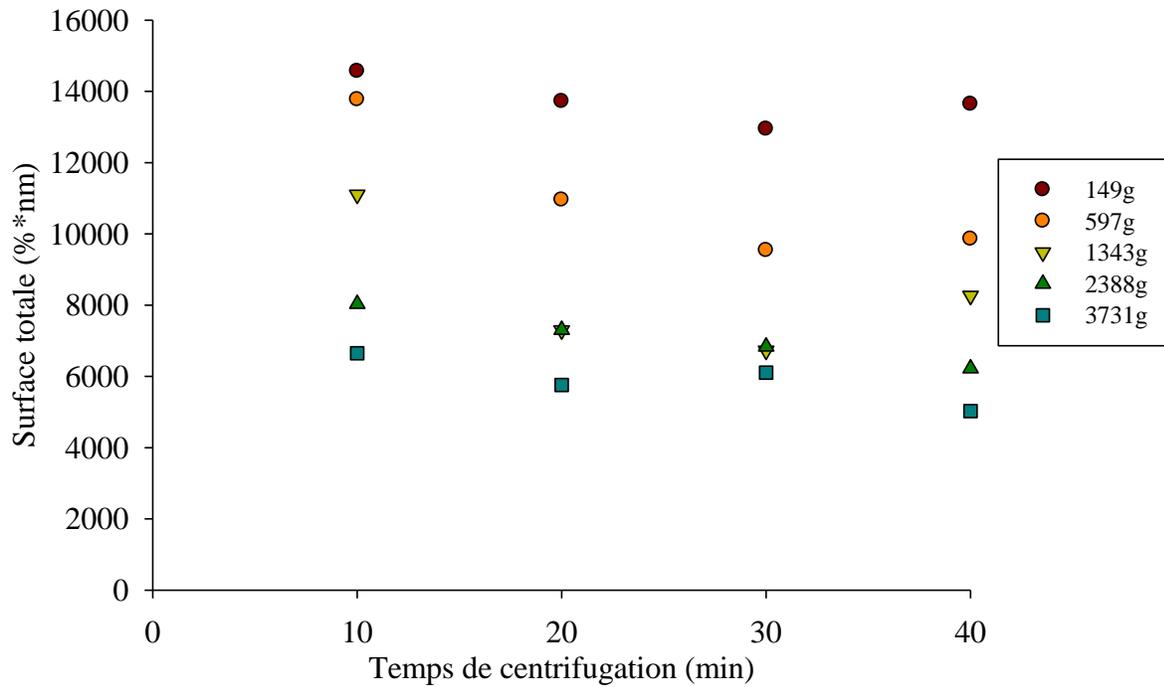


Figure 46: Surface du spectre granulométrique des particules en fonction des paramètres de centrifugation

Tableau 9 : Valeurs des constantes des modèles log-normal pour l'ajustement du spectre granulométrique, du coefficient de détermination et de l'analyse des variances pour chaque échantillon de jus clarifié de goyave

Paramètres de centrifugation		Constantes des modèles et paramètres de l'analyse des variances					
Vitesse (rpm)	Temps (min)	a	b	x ₀	R ²	Valeur de F	Probabilité (p)
149g (1000 rpm)	10	15631,2303	0,3732	1142,2940	0,9991	6884,3455	<0,0001
	20	23822,1460	0,2298	966,6824	0,9984	3815,1160	<0,0001
	30	19769,6168	0,2612	922,6080	0,9955	1324,8144	<0,0001
	40	11801,2795	0,4658	1040,1947	0,9990	6295,6201	<0,0001
597g (2000 rpm)	10	15787,0226	0,3482	983,7673	0,9987	4668,9589	<0,0001
	20	10913,1193	0,4006	806,1014	0,9980	2985,3766	<0,0001
	30	8533,0774	0,4463	731,5867	0,9976	2477,1187	<0,0001
	40	8068,4398	0,4746	733,1956	0,9996	16730,3293	<0,0001
1343g (3000 rpm)	10	9094,7421	0,4892	857,2055	0,9994	9681,9720	<0,0001
	20	7461,1000	0,3900	555,1124	0,9975	2348,0955	<0,0001
	30	7115,7952	0,3769	505,2511	0,9966	1734,6698	<0,0001
	40	6269,7107	0,4735	580,7774	0,9992	7287,9592	<0,0001
2388g (4000 rpm)	10	7383,4772	0,4339	608,2819	0,9987	4756,9925	<0,0001
	20	6075,1861	0,4797	560,3254	0,9993	8461,0370	<0,0001
	30	5485,8938	0,4968	537,9501	0,9949	1156,6211	<0,0001
	40	4887,3994	0,5077	495,4160	0,9973	2195,9962	<0,0001
3731g (5000 rpm)	10	6444,7337	0,4115	508,3661	0,9991	7024,2033	<0,0001
	20	5986,8620	0,3838	429,2792	0,9992	7350,1895	<0,0001
	30	5034,3938	0,4840	486,5226	0,9927	811,4094	<0,0001
	40	4235,7907	0,4733	397,8415	0,9973	2182,9271	<0,0001

L'augmentation de l'accélération centrifuge s'accompagne d'une diminution de la surface totale décrite par l'ensemble des particules de l'échantillon (Figure 46). Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de la vitesse de sédimentation des particules entraînant la sédimentation

progressive des particules de diamètre et de masse volumique plus réduits. Ceci aurait pour conséquence la diminution progressive de la proportion des particules grossières et l'augmentation de celle des particules fines dans la suspension (surnageant). Les forces de frottement qui agiraient sur les particules et diminueraient leur vitesse de sédimentation seraient, par conséquent, de plus en plus négligeables par rapport à la force centrifuge (Robatel et Borel, 1989a). De plus, l'augmentation de l'accélération centrifuge entraînerait une diminution progressive de l'effet des forces browniennes de diffusion qui agissent sur des particules fines, les maintiennent en suspension et s'opposent à leur sédimentation dans le cas d'une sédimentation gravitaire (Svarovsky, 2000). La conséquence est l'augmentation de la limpidité du jus de goyave à chair blanche telle que décrite à la Section 4.3.1.3.

La surface des spectres granulométriques de particules des échantillons centrifugés pendant 40 min augmente pour des accélérations centrifuges de 149g, 597g et 1343g (Figure 46). Cette augmentation pourrait être due au phénomène de détachement des agrégats de particules du culot dû à l'accélération centrifuge. La masse volumique des particules sédimentant à la surface du culot pour ces conditions opératoires pourrait entraîner la formation des agrégats relativement moins compacts due à une faible adhésion des particules. Ce détachement conduirait à la présence de particules plus volumineuses dans le surnageant, d'où les proportions élevées (comparées à celles obtenues avec 30 min de centrifugation) observées pour les échantillons de 40 min (Figure 45).

4.3.1.3 Effet des paramètres de centrifugation sur la limpidité du jus clarifié de goyave à chair blanche

La limpidité des différents jus clarifié de goyave à chair blanche varie entre 0 et $68,72 \pm 2,18$ % Transmittance. La limpidité de l'échantillon non centrifugé était inférieure à la limite de

détection de l'appareil (Figure 47) (Tableau 13, Annexe 6). L'effet du temps et de l'accélération centrifuge sur la limpidité décrit une tendance contraire à celle de la granulométrie moyenne des particules (Section 4.3.1.2). Une augmentation du temps ou de l'accélération centrifuge s'accompagne d'une augmentation de la limpidité comme l'ont montré Sagu et al. (2014). La sédimentation progressive des particules en suspension dans l'ordre inverse de leur granulométrie au cours de la centrifugation aurait un effet sur la limpidité du jus de goyave.

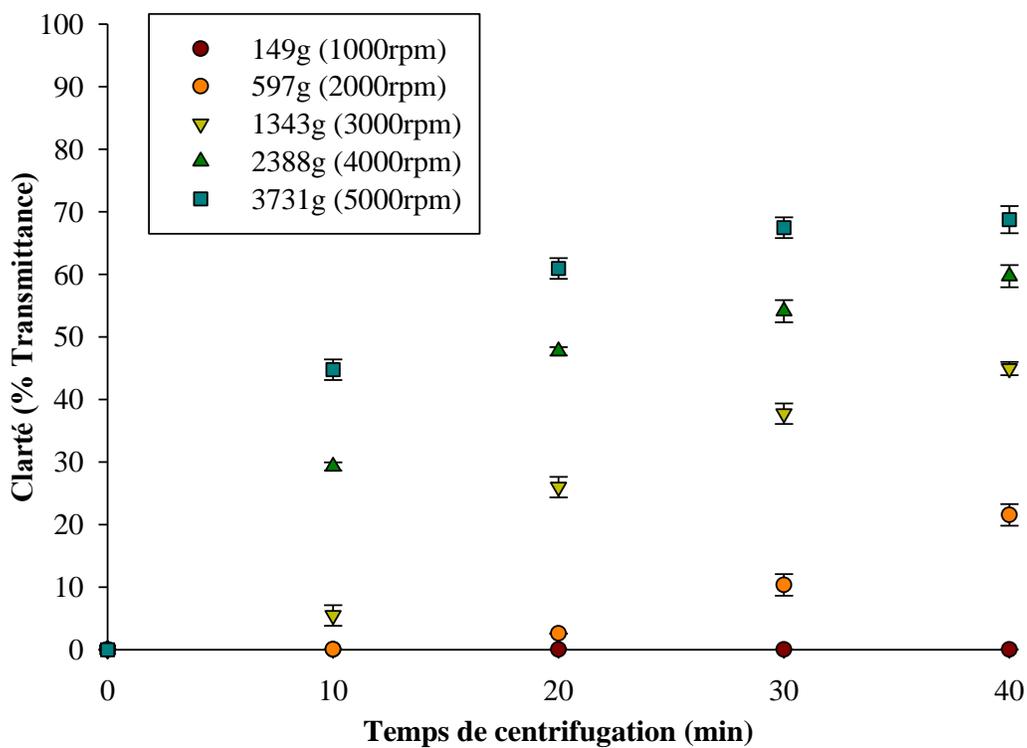


Figure 47: Limpidité du jus clarifié de goyave à chair blanche en fonction des paramètres de centrifugation

L'augmentation du pourcentage de transmittance au cours de la centrifugation pourrait être due à l'augmentation de l'intensité de la lumière diffusée causée par la réduction de la largeur du spectre granulométrique des particules colloïdales des jus de goyave. La limpidité du jus de goyave à chair blanche traduirait le comportement des particules en suspension et des macromolécules de

l'échantillon vis-à-vis du faisceau lumineux incident à la longueur d'onde d'étude. Elle serait liée à la turbidité de l'échantillon. Le plus petit diamètre de particule d'après la courbe de répartition granulométrique est 68 nm pour toutes les combinaisons temps – force centrifuge (Figure 45). La proportion des particules de cette granulométrie est inférieure à 0,3%. Il en résulte que toutes les particules présentes dans le jus de goyave à chair blanche ont un diamètre supérieur au dixième de la longueur d'onde, ($d > 66$ nm). Les valeurs de conductivité électrique (Section 4.3.1.6.4) traduisent la présence de charges électriques dans les différents échantillons de jus de goyave. Ces charges résulteraient entre autres de celles négatives des particules colloïdales du jus de goyave. La présence de ces charges entrainerait l'existence d'un champ électrique et d'une couche diffuse autour des particules. Lorsque la lumière ou l'onde électromagnétique incidente traverse la cuve de lecture, elle aurait des interactions avec ce champ électrique. Il en résulterait la diffusion dynamique de la lumière dans toutes les directions suivant des angles variables par toutes les particules (le diamètre de chaque particule étant supérieur au dixième de la longueur d'onde). La théorie de diffusion correspondante serait celle de Mie utilisée par le Zetasizer pour la détermination du diamètre hydrodynamique des particules et de l'intensité de diffusion correspondante (Section 4.3.1.2). Cette détermination permettrait de prouver que les particules colloïdales du jus de goyave à chair blanche seraient animées de mouvement brownien. Dans ce cas, l'intensité de la lumière diffusée par une particule prendrait en considération les angles minimal et maximal de diffusion (Malvern, 2013). La transmittance de l'échantillon de jus de goyave à chair blanche est le logarithme du rapport de l'intensité totale de la lumière diffusée par l'ensemble des particules et sortant de la cuve de lecture sur l'intensité de la lumière incidente à celle-ci.

Les grosses particules diffusent plus la lumière que les petites. L'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle au diamètre de la particule (Malvern, 2013). Les suspensions contenant des quantités élevées de particules grossières auront tendance à plus diffuser la lumière ; il en résulterait une faible valeur de l'intensité du rayonnement transmis ressortant de la cuve de lecture. La conséquence serait les faibles valeurs de transmittance. Les échantillons de jus de goyave à chair blanche obtenus après centrifugation à 149g ont des valeurs de limpidité pratiquement nulles (Figure 47). Dans la limite de détection de l'équipement, ces échantillons sont pratiquement opaques. La lumière incidente serait totalement diffusée par les particules présentes dans ces échantillons. L'intensité du rayonnement transmis ressortant de la cuve serait très faible qu'elle ne pourrait être détectée par l'appareil. La courbe de répartition granulométrique des particules des échantillons de 149g montre une prédominance des particules de diamètre compris entre 615 et 1718 nm (Figure 45). Ces diamètres sont majoritairement supérieurs à la longueur d'onde de lecture (660nm). Ces particules auraient de faibles vitesses de mouvement brownien et diffuseraient plus la lumière. De plus, une diffusion multiple de la lumière pourrait être effectuée par celles-ci conduisant à des effets d'interface et réduisant l'intensité transmise (Malvern, 2013). Cette plage de diamètre de particules a également été obtenue pour le jus de goyave à chair blanche centrifugé à 597g pendant 10 min (Figure 45). Ce qui expliquerait la limpidité nulle obtenue pour cet échantillon (Figure 47).

Pour les forces centrifuges de 1343g à 3731g, l'augmentation du temps s'accompagne d'une augmentation de la limpidité. Ces échantillons (à l'exception de ceux traités pendant 10 min à 1343g et 2388g) sont majoritairement constitués de particules de granulométrie inférieure à 660 nm (elles contribuent à plus de 75% de proportion). La diminution de la proportion des particules de diamètre donné en fonction du temps pour une force centrifuge (Figure 45) traduirait une

diminution du nombre de ces particules au cours de la centrifugation (Section 4.3.1.2). Il en résulterait une présence des particules de plus en plus fines dans le jus de goyave. Cette présence couplée à celle de particules grossières en proportion réduite aurait pour conséquence la réduction progressive du phénomène de diffusion des particules à l'intérieur du jus de goyave. Les particules fines diffusent moins la lumière que les grosses et l'intensité de diffusion pour des particules de granulométrie donnée dépend de leur nombre (Malvern, 2013). La conséquence serait une augmentation de l'intensité du rayonnement traversant le milieu et donc du pourcentage de transmittance. Ce sont ces phénomènes qui expliqueraient l'augmentation de la limpidité avec le temps pour les échantillons obtenus par centrifugation à 597g (Figure 47).

Pour l'accélération de 3731g, la limpidité augmente avec le temps tendant vers une valeur maximale de 70% (Figure 47). Cette observation corrobore avec celle faite par Sagu et al. (2014) qui ont obtenu une valeur de limpidité de 75% après centrifugation du jus de banane pendant 45 min à 10000 g. Les valeurs des pentes entre deux valeurs de temps de centrifugation diminuent avec l'augmentation du temps. L'augmentation de la limpidité entre 30 et 40 min de centrifugation est non considérable.

4.3.1.4 Effet des paramètres de centrifugation sur la teneur en pectine du jus de goyave

La teneur en pectine de l'échantillon non centrifugé était de $426,70 \pm 34,54$ mg/L. La centrifugation contribue à diminuer la teneur en pectine à une valeur comprise entre 238,69 à 19,23 mg/L (Figure 48). L'augmentation de la durée de centrifugation s'accompagne d'une diminution de la teneur en pectine. Cette diminution est significative dans le cas des échantillons centrifugés à 149g et 597g (Tableau 15, Annexe 6). Pour celles-ci, les teneurs en pectine diminuent avec une

diminution progressive des pentes entre deux valeurs consécutives de temps. Par contre, les échantillons de jus de goyave à chair blanche centrifugés à 1343g, 2388g et 3731g décrivent, au bout des 10 premières minutes, une diminution de plus de 85% de la teneur en pectine par rapport à celle de l'échantillon non centrifugé. Cette diminution est de l'ordre de 93% et 96% pour les accélérations de 2388g et 3731g, respectivement. La diminution considérable observée après 10 min est suivie d'une diminution négligeable entre les dixième et quarantième minutes de traitement ; les pentes sont de 1,52%, 0,84% et 0,03% pour 1343g, 2388g et 3731g, respectivement.

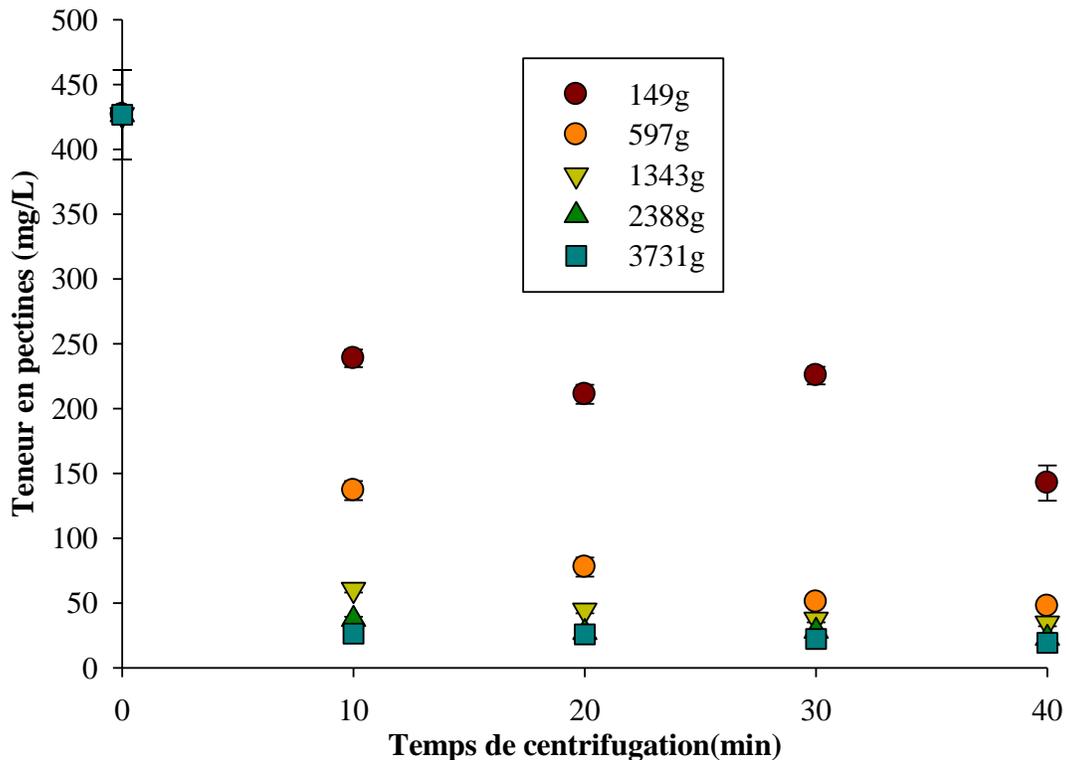


Figure 48: Teneur en pectine du jus clarifié de goyave à chair blanche en fonction des paramètres de centrifugation

La teneur en pectines au cours de la centrifugation suit une tendance similaire à la granulométrie moyenne des particules (Section 4.3.1.2). Il en découle que parmi les particules qui

sédimentent au cours de la centrifugation, figurerait la pectine ou les complexes particuliers d'oligomères de l'acide galacturonique et d'autres molécules (protéines) (Section 3.3.1) (van Jaarsveld *et al.*, 2005). La teneur en pectine du jus renseigne sur l'affinité des particules avec l'éthanol utilisé pour la précipitation au cours de sa détermination (Section 2.2.2.5). Les particules présentes dans le jus de goyave à chair blanche auraient des affinités différentes avec la solution d'éthanol pur (99% v/v) ; cette affinité serait fonction de la granulométrie, des propriétés de surface et de la masse volumique de la particule. Plus la particule serait petite et plus elle serait légère, plus sa solubilité dans l'éthanol serait élevée et moins elle sédimenterait au cours de la centrifugation. La réduction de la largeur du spectre granulométrique des particules avec l'augmentation de la durée de centrifugation pour une accélération donnée s'accompagne d'une augmentation de la proportion des particules fines (Figure 45) ayant une affinité élevée avec les molécules d'éthanol pour le ratio de solvant utilisé. La proportion des particules insolubles dans l'éthanol diminuerait progressivement au cours de la clarification. La diminution non considérable de la teneur en pectine pour des temps compris entre 10 et 40 minutes à des accélérations comprises entre 1343g et 3731g (Figure 48) pourrait s'expliquer par le fait que les particules qui résultent de la centrifugation présenteraient des variations non considérables d'affinité avec les molécules d'éthanol (Section 4.3.1.2). Ceci pourrait être étayé par le resserrement progressif des courbes de répartition granulométrique de particules autour de 200 à 1000 nm pour tous les échantillons obtenus à l'aide de ces forces centrifuges (Figure 45). Cette observation corrobore avec la diminution presque linéaire (pente de 10,74%, 7,65% et 5,65% pour 1343g, 2388g et 3731g respectivement) de la granulométrie moyenne des particules pour cette plage de temps de traitement correspondant aux mêmes valeurs de vitesses de centrifugation (Figure 43).

Pour une valeur donnée de durée de centrifugation, l'augmentation de l'accélération centrifuge s'accompagne d'une diminution de la teneur en pectine (Figure 48). Cette observation corrobore avec les résultats obtenus par Sagu et al. (2014) qui ont observé une diminution de la teneur en solides insolubles dans l'alcool (parmi lesquels figure la pectine) du jus de banane avec l'augmentation de l'accélération centrifuge pour une valeur donnée de temps de centrifugation.

4.3.1.5 Effet des paramètres de centrifugation sur la teneur en protéines du jus de goyave

La teneur en protéines du jus de goyave à chair blanche non centrifugé est de $713,24 \pm 23,87$ mg/L. La teneur en protéines diminue au cours du temps de clarification pour toutes les accélérations centrifuges appliquées (Figure 49). Pour les échantillons centrifugés à 3731g, cette diminution au bout des 10 premières minutes est de l'ordre de 50% de la concentration en protéine du jus de goyave à chair blanche non centrifugé. Cette diminution considérable est suivie d'une autre négligeable entre les dixième et quarantième minutes. Pour les accélérations de 1343g et 2388g, la diminution considérable (50,29% et 45,30% de valeur du jus de goyave à chair blanche non centrifugé) au bout de 10 minutes est suivie d'une autre négligeable (pente 5,64% et 3,46%, respectivement) entre 10 et 30 minutes (Tableau 17, Annexe 6). Dans le cas de l'accélération centrifuge de 597g, il y a une diminution de la teneur en protéines avec une diminution progressive de la pente entre deux valeurs consécutives du temps de centrifugation. Cette diminution n'est pas considérable entre 20 et 40 min. Pour la vitesse de 149g, la diminution de la teneur en protéine au bout des 10 premières minutes (21% de la valeur du jus de goyave à chair blanche non centrifugé) est suivie d'une diminution modérée (16,10% de la valeur à 10 minutes) entre la dixième minute et la quarantième minute.

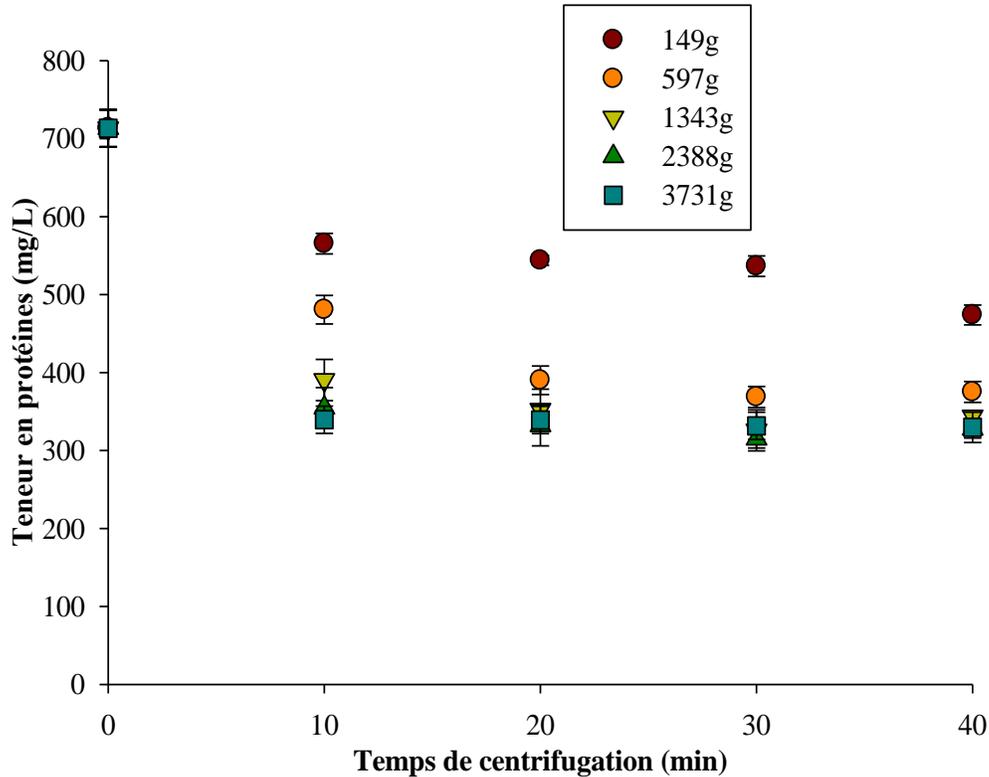


Figure 49: Teneur en protéines du jus clarifié de goyave à chair blanche en fonction des paramètres de centrifugation

La teneur en protéines au cours de la centrifugation décrit une tendance similaire à celle de la teneur en pectine et de la granulométrie des particules. Il en découle que les particules protéinées figureraient parmi celles qui sédimentent au cours de la centrifugation. Ces particules pourraient être entre autres celles issues de la complexation des molécules de protéines avec d'autres molécules. En effet, les molécules des protéines pourraient être complexées par des oligomères de l'acide galacturonique pour former des particules appelées « troubles » (Section 3.3.1). La similarité de tendances permettrait d'étayer ce phénomène de complexation entre les molécules de protéines et les oligomères de l'acide galacturonique. Les particules de troubles résulteraient également des interactions entre les molécules de protéines et de polyphénols entraînant la

formation des tannins (Siebert, 1999). Elles pourraient également être le résultat de la formation de complexes entre les molécules de protéines et certains anions chélateurs présents dans le milieu.

L'augmentation de l'accélération centrifuge pour une valeur donnée de temps s'accompagne d'une diminution de la teneur en protéines (Figure 49). Cette observation corrobore avec celle faite par Sagu et al. (2014) qui ont mis en évidence la diminution de la teneur en protéines du jus de banane de 1060 mg/l à 610 mg/l lorsque l'accélération centrifuge passait de 2000g à 10000g.

4.3.1.6 Effet des paramètres de centrifugation sur les autres caractéristiques physicochimiques du jus de goyave

4.3.1.6.1 Effet des paramètres de centrifugation sur la teneur en sucres solubles totaux (TSS) et en acide galacturonique

La teneur en sucres solubles totaux de l'échantillon initial est de $2,3 \pm 0,0$ °Brix. La centrifugation entraîne une augmentation de la teneur en sucres solubles totaux (Figure 50). La teneur en sucres solubles totaux des échantillons traités est supérieure à celle de l'échantillon non centrifugé. Toutefois, l'augmentation du temps et de l'accélération centrifuge ne présente pas d'effet considérable entre les différents échantillons traités (Tableau 20, Annexe 6).

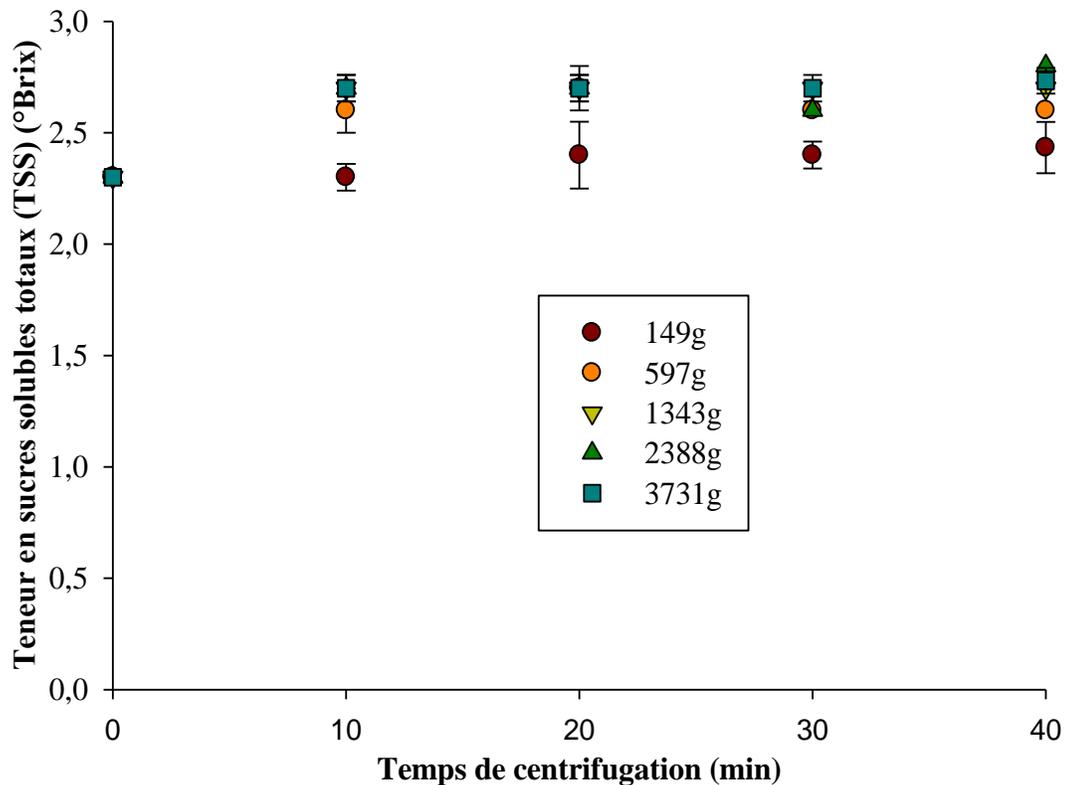


Figure 50: Teneur en sucres solubles totaux du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation

La teneur en sucres solubles totaux est un paramètre qui renseigne sur les composés solubles et assimilables au saccharose. La dissolution de ces composés s'accompagnerait de leur dispersion dans le milieu aqueux. L'augmentation des valeurs des paramètres de centrifugation n'aurait pas de ce fait d'effet considérable sur la teneur en sucres solubles totaux ; la centrifugation n'étant pas une opération indiquée pour séparer les composés solubles du jus ayant une faible masse moléculaire. Ceci pourrait également expliquer l'effet non considérable des paramètres de centrifugation sur la teneur en acide galacturonique du jus de goyave à chair blanche (Figure 51) (Tableau 12, Annexe 6). Ces sucres réducteurs étant solubles en milieux aqueux, ils ne pourraient être séparés de ce milieu que s'ils sont complexés par d'autres composés avec formation d'agrégat.

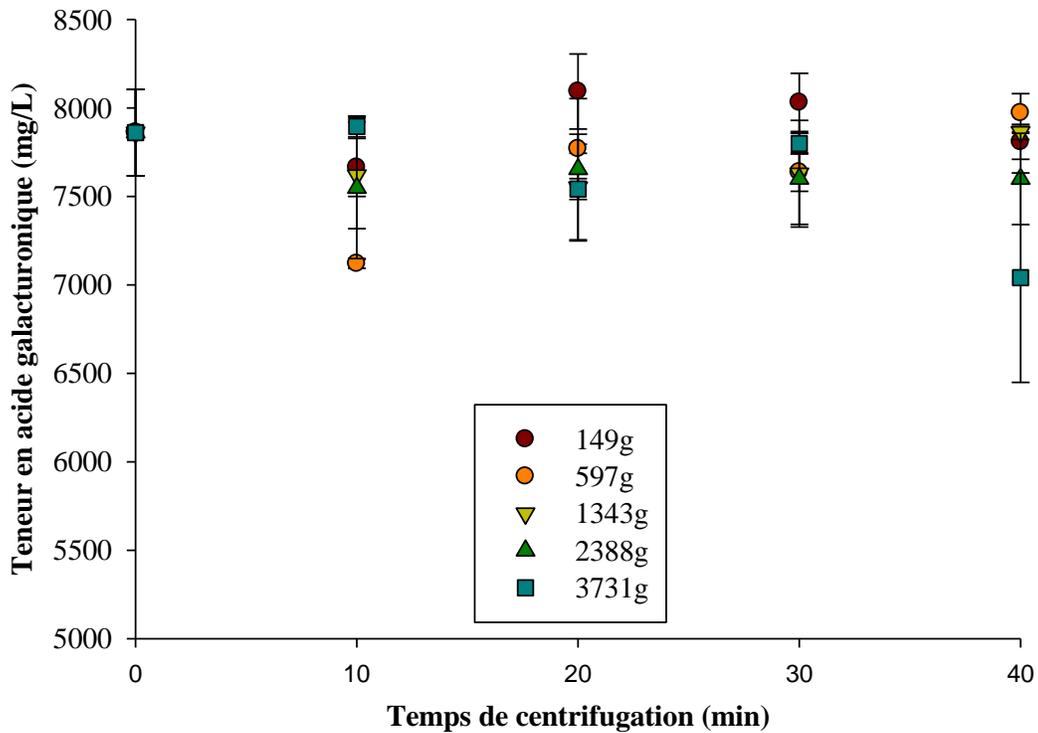


Figure 51: Teneur en acide galacturonique du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation

4.3.1.6.2 Effet des paramètres de centrifugation sur la teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche de l'échantillon initial est de $2,85 \pm 0,12\%$ m/m. Il apparaît que la centrifugation contribue à une diminution considérable de la teneur en matière sèche du jus de goyave à chair blanche par rapport à l'échantillon non centrifugé (Figure 52) (Tableau 19, Annexe 6).

La diminution considérable de la teneur en matière sèche pourrait s'expliquer par le fait que lorsqu'une suspension est soumise à une accélération centrifuge, certaines particules en fonction de la différence entre leur masse volumique et celle de la phase continue, vont se

sédimenter au fond du tube de centrifugation. Le pourcentage de matière sèche du surnageant serait, par conséquent inférieur à celle de la suspension initiale.

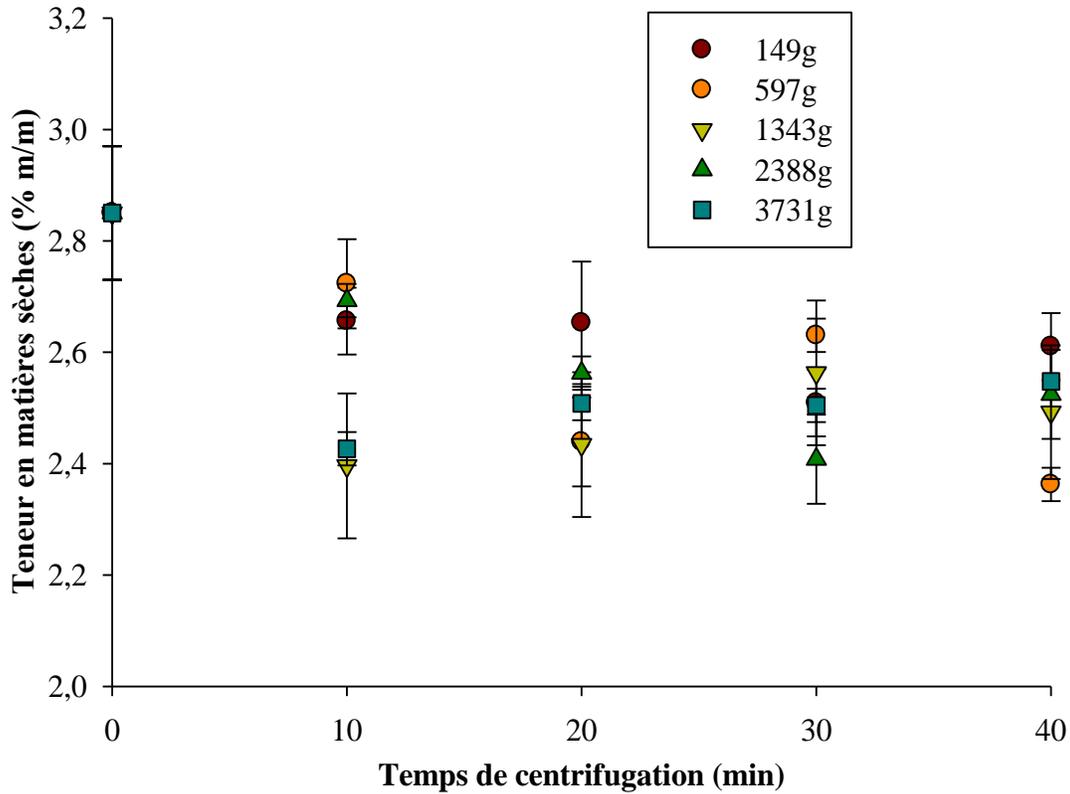


Figure 52: Teneur en matière sèche du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.

La variation des paramètres de centrifugation n'affecte pas considérablement la teneur en matière sèche des échantillons clarifiés (Figure 52). Cette observation corrobore avec celle du rendement de centrifugation décrite à la Section 4.3.1.1.

4.3.1.6.3 Effet des paramètres de centrifugation sur valeur du pH

Le pH du jus de goyave à chair blanche non centrifugé est de $3,71 \pm 0,00$. Le pH ne varie pas considérablement avec l'augmentation des paramètres de centrifugation (Figure 53) (Tableau 16, Annexe 6).

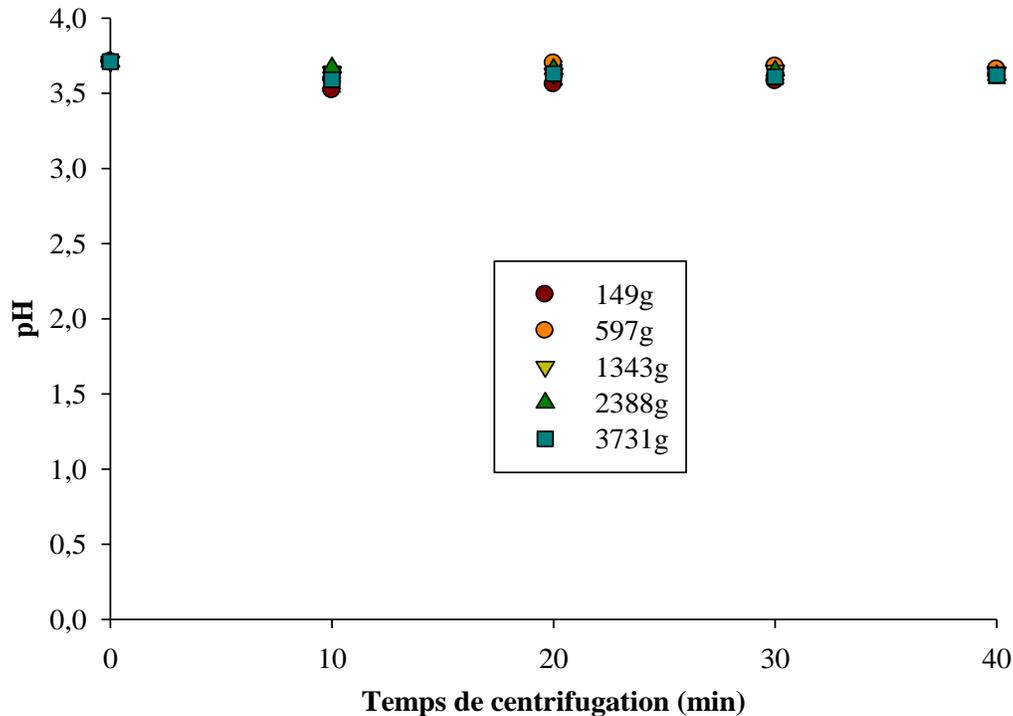


Figure 53 : pH du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation.

Le pH est un indicateur de la présence des composés possédant des groupements alcalins ou acides. Dans le cas du jus de goyave, les monomères et les oligomères de l'acide galacturonique (dont certains étant solubles en milieu aqueux) pourraient être entre autres les composés responsables des valeurs de pH obtenues. La faible variation du pH entre les différents échantillons pourrait être expliquée par le comportement tampon de l'acide galacturonique (Section 3.3.3.1).

4.3.1.6.4 Effet des paramètres de centrifugation sur la conductivité électrique

La conductivité électrique du jus de goyave à chair blanche non centrifugé est de $1828,33 \pm 7,51$ mS/cm. La centrifugation contribue à une diminution de la conductivité électrique des échantillons clarifiés (Figure 54) (Tableau 14, Annexe 6). Ceci montre que l'échantillon non centrifugé conduirait mieux l'électricité que les échantillons centrifugés. L'échantillon non centrifugé contiendrait des particules chargées.

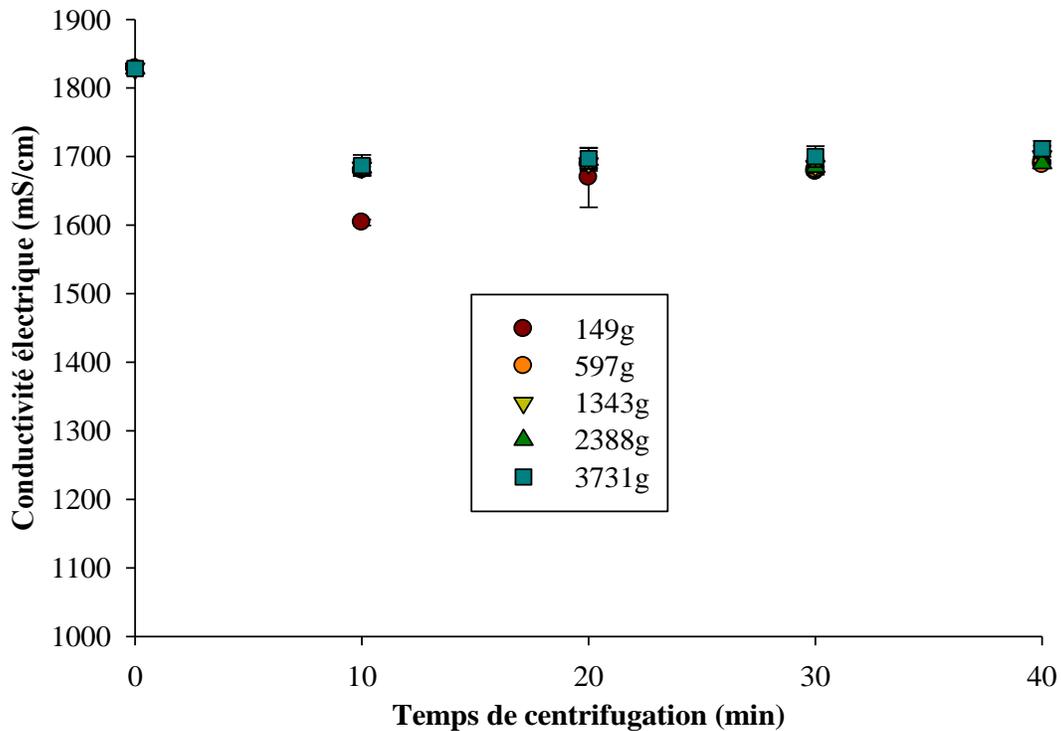


Figure 54: Conductivité électrique du jus clarifié en fonction des paramètres de centrifugation

Au cours de la centrifugation certaines particules se sédimenteraient ; le jus de goyave qui en résulte contiendrait des particules chargées, mais la charge électrique totale serait inférieure à celle de l'échantillon initial. La variation des paramètres de centrifugation n'entraîne pas une variation considérable de la conductivité électrique des échantillons (Figure 54). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les particules colloïdales des différents échantillons auraient des charges électriques dont le total n'entraîne pas une variation considérable de la conductivité quelles que soient les valeurs des paramètres de clarification. Ces particules colloïdales sont négativement chargées. La conductivité des échantillons est également le résultat de la charge des ions dissous présents dans les échantillons.

4.3.2. Détermination des caractéristiques dimensionnelles et opérationnelles d'une centrifugeuse continue à assiettes

4.3.2.1 Détermination des caractéristiques de fonctionnement de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique

Considérant l'accélération de la pesanteur de $9,807 \text{ m/s}^2$ et le rayon maximal du rotor (133,5 mm), les Forces Centrifuges Relatives (FCR) correspondant aux vitesses de centrifugation de 3000, 4000 rpm et 5000 rpm sont **1343g**, **2388g** et **3731g**, respectivement.

Les rayons maximal et minimal de sédimentation sont ceux correspondant aux conditions d'étude (pour le volume d'alimentation utilisé) (Tableau 6). Ces rayons et les conditions d'opération ont permis de déterminer le facteur Σ de la centrifugeuse pour 1343g, 2388g et 3731g. Celui-ci a été de **0,475 m²**, **0,844 m²** et **1,318 m²**, respectivement. L'augmentation de la vitesse de rotation s'accompagne d'une augmentation de l'aire équivalente théorique.

4.3.2.2. Détermination de la performance de séparation de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique

Le taux de clarification est un facteur important pour la comparaison de la performance de séparation de la centrifugeuse pour les différentes conditions opératoires. La performance de la centrifugeuse pour les différentes conditions opératoires est décrite par la Figure 55.

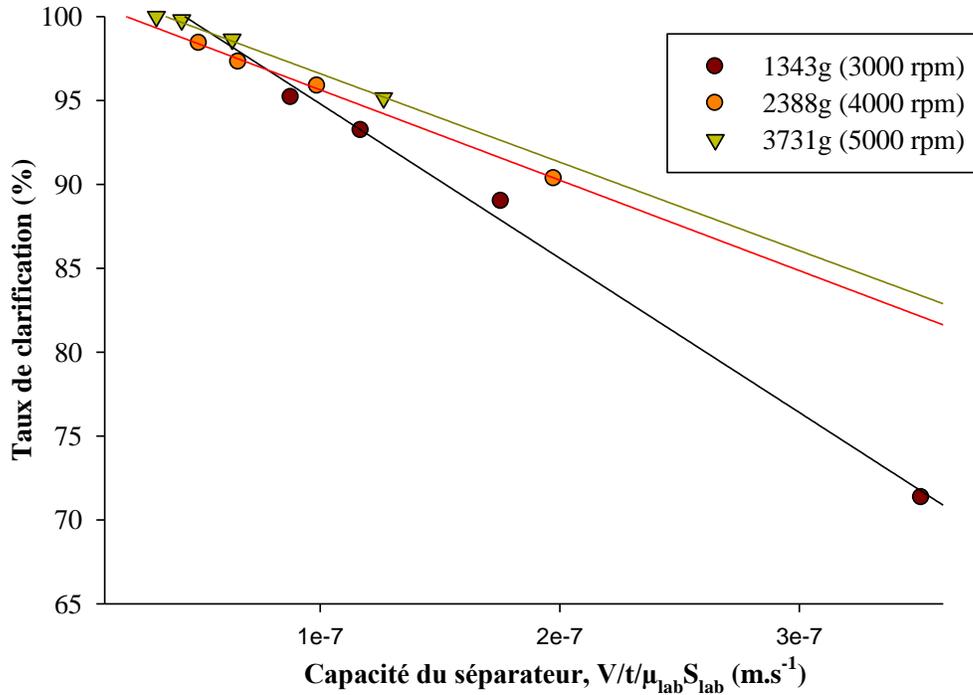


Figure 55 : Performance de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique pour les accélérations centrifuges 1343g, 2388g et 3731g

Pour toutes les accélérations centrifuges, le taux de clarification diminue avec la capacité du séparateur (Figure 55). Pour l'accélération de 1343g, il diminue de 95% à 71% pour des capacités de séparation allant de $8,77 \times 10^{-8}$ à $3,51 \times 10^{-7} m.s^{-1}$. Pour 2388g et 3731g, il diminue de 98,41 à 90,35% et de 100% à 95,15% pour des capacités allant de $4,94 \times 10^{-8}$ à $1,97 \times 10^{-7} m.s^{-1}$ et de $3,16 \times 10^{-8}$ à $1,26 \times 10^{-7} m.s^{-1}$, respectivement. La capacité du séparateur traduit le rapport du débit d'alimentation par unité de surface de sédimentation. Le taux de clarification renseigne sur la performance de la centrifugeuse en fonction des conditions opératoires. Elle décrit en fait le comportement qu'aurait un bac de sédimentation gravitaire, si celui-ci, pour une surface de sédimentation précise, était alimenté avec un débit donné de jus de goyave. La diminution du taux de clarification en fonction de la capacité du séparateur pourrait être expliquée par l'augmentation de la quantité de solides sédimentés avec la diminution du débit d'alimentation. L'écoulement de

la suspension étant relativement lent couplé à l'effet réduit du lessivage, le temps de séjour de la suspension dans le bac serait élevé entraînant une augmentation de la quantité de solides sédimentés (Koller, 2009). Pour un temps de traitement donné, l'augmentation de l'accélération centrifuge correspond à une augmentation de la surface, ce qui s'accompagne d'une diminution de la capacité, avec pour conséquence une augmentation du taux de séparation (Figure 55).

L'augmentation de la vitesse de sédimentation entraîne un resserrement progressif du nuage des points (Figure 55). Pour chaque accélération, les différents points expérimentaux ont été ajustés. Ces points décrivent une régression linéaire dans chaque cas. Les coefficients de détermination obtenus sont **0,997**, **0,999** et **0,998**, pour 1343g, 2388g et 3731g, respectivement. Pour chacune de ces vitesses, une corrélation linéaire acceptable entre le taux et la capacité a été obtenue. Les pentes de chacune des droites de corrélation sont : $-9,20 \cdot 10^7$, $-5,39 \cdot 10^7$ et $-5,27 \cdot 10^7$, pour 1343g, 2388g et 3731g, respectivement. Il apparaît que l'augmentation de l'accélération centrifuge entraîne une diminution en valeur absolue de la pente de la droite de régression. Cette diminution serait liée à la diminution de la surface des courbes de répartition granulométrique des particules (Figures 45 et 46). Cette observation est contraire à celle faite par Boychyn et al. (2004) qui avaient expliqué les valeurs absolues élevées de la pente par le resserrement de la courbe de répartition granulométrique des particules, mais ne l'avaient pas prouvé par une courbe précise.

La corrélation linéaire entre le taux de centrifugation et la capacité du séparateur pour chaque accélération a permis de conclure que la performance de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique permet de prédire celle d'une centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes ayant un facteur sigma donné. L'expression de la droite de régression permet de déterminer le débit d'alimentation de cette centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes en vue de l'obtention du taux de séparation correspondant.

Une performance similaire pourrait être observée pour les couples 1343g/40 min, 2388g/20 min et 3731g/10 min (Figure 55). Cette observation corrobore avec celle faite par Maybury et al. (2000). Ils ont rapporté une différence non considérable du taux de clarification obtenue avec les valeurs de FCR 1312g et 3870g. De plus, à l'exception du jus obtenu après centrifugation à 1343g pendant 10 min, une différence de taux de séparation inférieure à 10% a été obtenue pour toutes les conditions opératoires. Cette différence non considérable a également été observée pour plusieurs paramètres physicochimiques obtenus avec ces conditions opératoires. L'accélération de 1343g a été retenue pour la suite des travaux.

4.3.2.3 Détermination de la granulométrie maximale de particule (x_{max})

La Figure 56 présente la variation de la probabilité ou "*grade efficiency*" de chaque particule du jus de goyave à chair blanche clarifié à 1343g en fonction de sa granulométrie. La probabilité varie de 0 à 1 pour toutes les durées de centrifugation (Figure 56). La plage de granulométrie de particules varie de 68 à 3010 nm. Pour toutes les durées de centrifugation, des probabilités négatives ont été obtenues pour des granulométries variant entre 68 et 825 nm pour les échantillons de 20 et 30 min, et 68 et 893 nm pour l'échantillon de 40 min. Ces valeurs négatives seraient dues à la présence dans le jus de goyave à chair blanche non centrifugé des particules de granulométrie inférieure à 893 nm à de très faibles proportions ne permettant pas leur détection par le Mastersizer. Au-delà de cette granulométrie, une augmentation de la probabilité en fonction de la granulométrie des particules est observée. Cette augmentation se produit jusqu'à une certaine granulométrie au-delà de laquelle la courbe de probabilité se stabilise à la valeur de 1. Cette granulométrie est la limite de séparation ou granulométrie maximale et est spécifique à chaque temps de centrifugation. Elle est de 2669, 2200 et 1783 nm, pour 20, 30 et 40 min respectivement. La limite de séparation (x_{max}) représente la granulométrie de la particule ayant la probabilité la plus

faible de se retrouver dans le surnageant (jus de goyave) lors de la centrifugation dans les conditions expérimentales correspondantes. Toutes les particules ayant une granulométrie supérieure à celle-ci seront éliminées lors de la centrifugation dans les conditions de clarification et se retrouveront dans le culot.

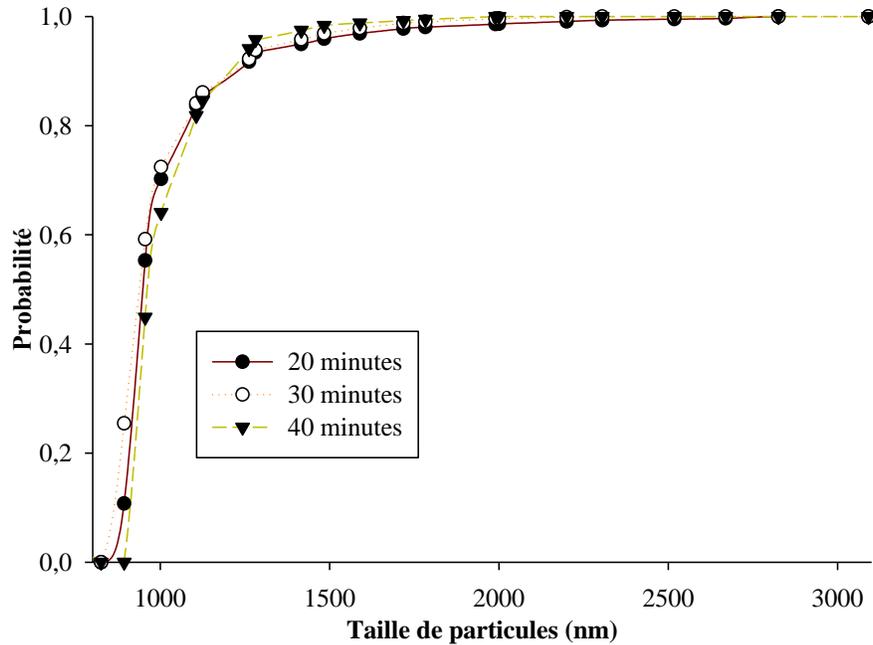


Figure 56: Variation du "grade efficiency" en fonction de la granulométrie des particules pour les échantillons clarifiés à 1343g

Pour les diamètres de particules compris entre 68 et 1262 nm, la probabilité augmente de manière raide avec la granulométrie de particule (Figure 56). Pour cette plage de granulométrie, une différence considérable peut être observée entre les différents temps de centrifugation. Cette observation peut être vérifiée sur la courbe de répartition granulométrique des particules. Une différence considérable des fréquences de particules de diamètre donné est observée avec l'augmentation du temps de centrifugation (Figure 45). Pour une durée donnée, une augmentation du diamètre de particule de l'ordre de 100 nm s'accompagne d'une augmentation considérable de

la probabilité d'une valeur supérieure à 0,1. Cette tendance renseigne sur la sensibilité de l'opération de centrifugation. Deux particules de diamètre voisin auraient des vitesses de sédimentation considérablement différentes entraînant une élimination plus nette de la plus grosse d'entre elles.

Au-delà de 1262 nm, les probabilités augmentent de façon non considérable vers 1 (Figure 56). Ainsi deux particules de différence de granulométrie de 500 nm ont des probabilités égales d'être éliminées à l'issue de la centrifugation. De plus, une différence négligeable des probabilités est observée avec l'augmentation du temps de centrifugation. Ces observations corroborent avec les fréquences obtenues pour chaque diamètre de particules (Figure 45).

4.3.2.4 Détermination du débit d'alimentation des centrifugeuses à assiettes de caractéristiques dimensionnelles connues

Les facteurs sigma utilisés pour cette détermination sont ceux correspondant à 1343g. Le Tableau 10 donne les débits d'alimentation des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes correspondant à chaque durée de fonctionnement de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique.

Pour une centrifugeuse-décanteuse donnée, l'augmentation de la durée de fonctionnement de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique entraîne une diminution de son débit d'alimentation pour assurer une performance similaire à celle-ci de cette dernière (Tableau 10). De même, l'augmentation du facteur sigma entraîne une augmentation du débit d'alimentation pour une durée donnée de fonctionnement de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique.

Tableau 10: Débits d'alimentation calculés pour chacune des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes commerciales

Modèles	Facteur Σ (m²)	Durée d'opération de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique (min)	Débit d'alimentation de la centrifugeuse-décanteuse continue (l/hr)
Westfalia SAOOH	404,351	20	102,152
		30	68,101
		40	51,076
GEA OTC 2-03-107	204,469	20	51,655
		30	34,437
		40	25,828
SC6-06-076	857,071	20	216,523
		30	144,349
		40	108,262
Westfalia CSA-1	387,536	20	97,904
		30	65,269
		40	48,952
Frau CN2S	326,023	20	82,364
		30	54,909
		40	41,182
Culturefuge 100™	1666,380	20	420,980
		30	280,653
		40	210,490

Pour une durée de fonctionnement donnée de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique, le modèle de centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes Culturefuge 100™ est celui qui a le débit d'alimentation le plus élevé. Ne disposant ni des prix des centrifugeuses, ni de leurs

spécifications techniques, le principal critère de choix était celui du débit d'alimentation. Ce modèle a été retenu pour la détermination du seuil de coupure. Toutefois, le choix définitif d'un modèle de centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes dépendra de l'opérateur selon le volume d'échantillon à traiter et le débit d'alimentation correspondant.

4.3.2.5 Détermination de la granulométrie équiprobable (x_{50})

La Figure 57 présente l'évolution de la probabilité théorique en fonction de la granulométrie des particules pour toutes les durées de centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes.

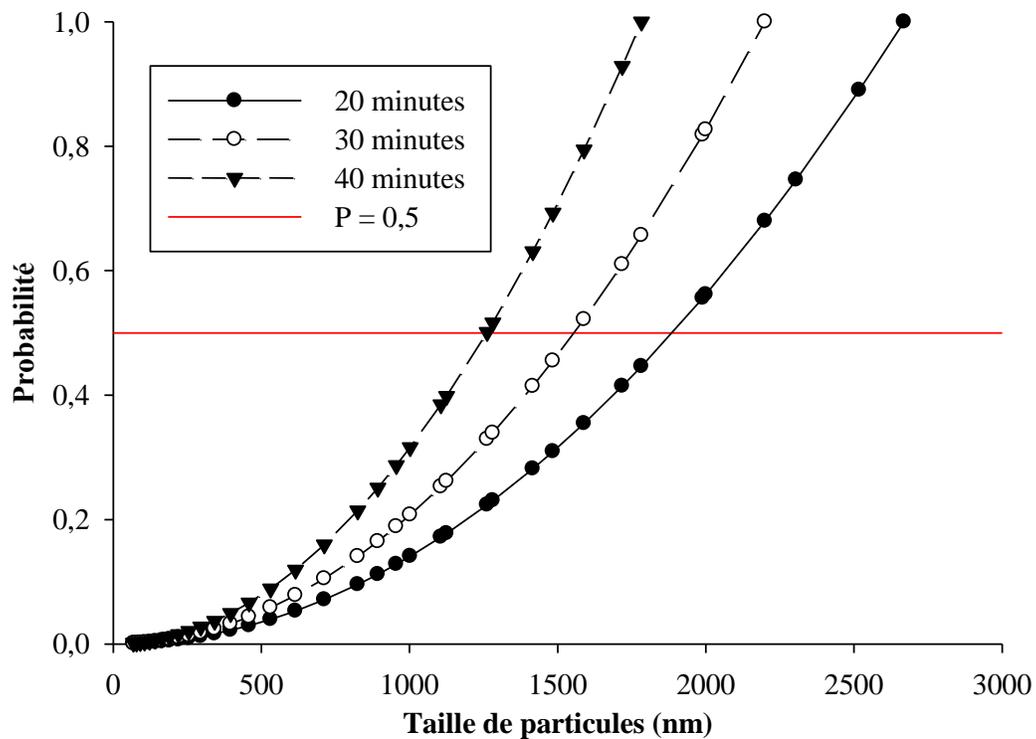


Figure 57: Probabilité en fonction de la granulométrie des particules pour les centrifugeuses-décanteuses continues à disques

Pour chacune des durées de centrifugation à 1343g, l'augmentation de la probabilité avec l'augmentation de la granulométrie des particules pour des granulométries inférieures à x_{max} est

observée (Figure 57). Pour des granulométries supérieures à x_{max} , la probabilité a été ramenée à 1. Cette courbe décrit la probabilité pour des particules de granulométrie donnée d'être éliminées par la centrifugation, si la suspension initiale n'était constituée exclusivement que d'elles. Il s'agit de la probabilité qui serait obtenue si le jus de goyave à chair blanche était clarifié à l'aide d'une centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes fonctionnant à 1343g. Le seuil de coupure (x_{50}) qui est la granulométrie correspondant à une probabilité de 0,5 a été prédit grâce à la ligne horizontale en rouge. Cette granulométrie varie pour chacune des durées de traitement ; elle est de **1887**, **1556**, **1261 nm**, pour 20, 30 et 40 min, respectivement. Pour l'équipement, cette granulométrie représente la granulométrie ayant une répartition égale à la fois dans le surnageant (jus de goyave à chair blanche clarifié) et dans le culot (solide sédimenté) pour les différents temps de centrifugation. L'augmentation du temps de centrifugation entraînerait une diminution du seuil de coupure (Figure 57). L'augmentation du temps de centrifugation s'accompagne d'une diminution de la surface du spectre granulométrique des particules comme relevé à la Section 4.3.1.2. Cette diminution de la surface s'accompagnerait d'une diminution de la probabilité pour des particules de granulométrie précise de se retrouver dans le surnageant à l'issue de la centrifugation.

4.4 CONCLUSION PARTIELLE

En somme, le premier objectif de ce chapitre était de déterminer l'effet du temps et de la vitesse de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche. L'augmentation du temps et de l'accélération centrifuge a contribué à une diminution considérable de la teneur en protéine, en pectine résiduelle et de la largeur du spectre granulométrique des particules, ainsi que de la surface décrite par la courbe de répartition granulométrique des particules. Par contre, elle a conduit à une augmentation considérable de la

limpidité et de la teneur en sucres solubles totaux (à l'exception de 149g) du jus centrifugé de goyave à chair blanche. La centrifugation n'a pas eu d'effets considérables sur le pH, la teneur en acide galacturonique, la teneur en matière sèche. Pour des vitesses supérieures ou égales à 1343g, une différence non considérable des paramètres physicochimiques a été observée entre les échantillons. Un rendement en jus de 95% a été obtenu pour des forces centrifuges supérieures à 597g. L'hypothèse formulée pour le premier objectif était : les paramètres physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche dépendent des conditions de centrifugation. Celle-ci est vérifiée pour la limpidité, la largeur du spectre granulométrique des particules, la surface de la courbe de répartition granulométrique des particules, les teneurs en protéines et pectines.

Le deuxième objectif de ce chapitre était d'identifier les caractéristiques opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue à partir de la performance d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. Il apparaît qu'une différence de moins de 10% a été observée entre le taux de clarification obtenu à 1343g (excepté pendant 10 min), 2388g et 3731g. La performance optimale de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique à 1343g a permis d'obtenir des limites de séparation comprises entre 1783 et 2669 nm. A partir de cette performance, celle de la centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes a été déterminée. La centrifugeuse-décanteuse continue Culturefuge 100TM était le modèle permettant d'avoir le débit d'alimentation le plus élevé. Pour ce modèle, des débits d'alimentation à 1343g allant de 421 l/h à 210 l/h pour des temps de fonctionnement allant de 20 à 40 min ont été obtenus. Les seuils de coupure compris entre 1887 nm et 1261 nm ont été déterminés. La détermination des débits d'alimentation des centrifugeuses-décanteuses continues à assiettes a permis de vérifier l'hypothèse : le taux de clarification du jus de goyave à chair blanche d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique fixe les limites de fonctionnement d'une centrifugeuse-décanteuse continue.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En somme, l'objectif général du présent travail était de dépectiniser la purée de goyave à chair blanche (*Psidium guajava*) cv Lucknown – 49 par les pectinases industrielles d'*Aspergillus niger* et de clarifier le jus par centrifugation. Cet objectif a été décliné en quatre spécifiques. Le premier a porté sur la détermination du mécanisme de dépectinisation enzymatique de la purée de goyave à chair blanche. Il en ressort que la dégradation de la pectine commerciale décrivait une cinétique de type michaélien. Les paramètres cinétiques des enzymes (K_M et le V_{max}) ont été déterminés. La dépectinisation de la purée de goyave à chair blanche suivait un mécanisme décrit par le modèle de Hill pour toutes les concentrations en enzymes. Le taux maximal d'hydrolyse de la pectine de 85% obtenu à l'issue du traitement enzymatique traduit l'impossibilité de sa dégradation complète en monomère de l'acide galacturonique due à l'inhibition des polygalacturonases d'*A. niger* par les produits de la réaction. Le modèle de cette dépectinisation permet d'estimer la vitesse de la réaction correspondant aux conditions de réaction, de même que la concentration résiduelle en pectine. Les deux modèles cinétiques selon que le substrat soit en milieu simple (pectine commerciale) ou en milieu complexe (pectine de goyave) ont permis de vérifier l'hypothèse formulée : l'hydrolyse enzymatique de la pectine de goyave à chair blanche n'obéit pas au mécanisme classique de Michaelis Menten.

La deuxième partie de ce travail avait pour objectif de déterminer l'effet de la concentration en pectinases et du temps de contact enzyme-purée sur les caractéristiques physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la dépectinisation. La désintringation du réseau macromoléculaire de la pectine s'accompagnait d'une diminution de 93% de la viscosité et du pH, d'une augmentation considérable de la teneur en acide galacturonique, la couleur et le degré Brix. Le traitement n'a pas eu d'effet considérable sur les teneurs en protéines et polyphénols, la

conductivité électrique, la capacité antioxydante du jus de goyave. Les images des extraits séchés obtenues grâce au microscope électronique à balayage avec émission de champ ont permis de mettre en évidence le phénomène de liquéfaction avec une diminution de la granulométrie des particules, une amélioration de l'homogénéité des échantillons et une prédominance de la phase liquide avec l'augmentation de la concentration en enzyme. L'hypothèse formulée pour ce chapitre n'était vérifiée que pour la teneur en acide galacturonique. Celle-ci était : les paramètres physicochimiques du jus de goyave à chair blanche issu de la depectinisation dépendent de la concentration en pectinases et de temps de contact enzyme-purée.

Le premier objectif de la dernière partie de ce travail était de déterminer l'effet du temps et de la vitesse de centrifugation sur les caractéristiques physicochimiques du jus clarifié de goyave à chair blanche. Le rendement maximal de jus de goyave à chair blanche obtenu est de $96 \pm 2\%$ m/m. La centrifugation a contribué à une diminution considérable des teneurs en protéine, pectine résiduelle, en matière sèche, de la surface des courbes de répartition granulométrique. Par contre, elle a contribué à une augmentation de la limpidité, de la teneur en sucres solubles totaux, mais elle n'avait pas d'effets considérables sur la teneur en acide galacturonique et le pH. La centrifugation conduit à une réduction de la largeur du spectre de particules du jus dépectinisé de goyave à chair blanche de [0 – 900 000 nm] à [0 – 3090 nm]. La Force de 1343g était celle permettant d'avoir une performance optimale de séparation à l'aide de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. L'hypothèse était vérifiée pour la teneur en protéines, en pectines, la limpidité du jus et la largeur du spectre granulométrique des particules.

Le deuxième objectif du dernier chapitre était d'identifier les caractéristiques opérationnelles d'une centrifugeuse-décanteuse continue à partir de la performance d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique. La performance de clarification du jus de goyave à

chair blanche de la centrifugeuse de laboratoire à rotor conique à 1343g conduit à l'obtention d'une limite de séparation de 1783nm et un seuil de coupure de 1261 nm pour un temps de centrifugation de 40 min à l'aide du modèle de centrifugeuse-décanteuse continue à assiettes Culturefuge 100TM. L'hypothèse formulée pour cette partie a été vérifiée : le taux de clarification du jus de goyave à chair blanche d'une centrifugeuse de laboratoire à rotor conique fixe les limites de fonctionnement d'une centrifugeuse-décanteuse continue.

PERSPECTIVES

Ce travail pourrait être complétée par :

- L'étude de la clarification de jus de goyave à chair blanche à l'aide du modèle de centrifugeuse-décanteuse Culturefuge 100TM ;
- L'étude de la stabilité du jus de goyave à chair blanche au cours du stockage après la centrifugation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ✓ Ahmed, B., Uddin, M. B., & Jubayer, M. F. (2014). Extraction and standardization of selected fruit juices by enzymatic process. *Peak Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 18 – 27.
- ✓ Ali, D. O. M., Ahmed, A. R., & Babikir, E. B. (2014). Physicochemical and nutritional value of red and white guava cultivars grown in Sudan. *Journal of Agri-Food and Applied Sciences*, 2(2), 27 – 30.
- ✓ Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21 – 28.
- ✓ Altendorf, S. (2018). Minor Tropical Fruits : Mainstreaming a niche market. *Food Outlook*, FAO, 62 – 74.
- ✓ Akesowan, A., & Choonhahirun, A. (2013). Effect of enzyme treatment on guava juice production using response surface methodology. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(1), 114 – 120.
- ✓ Ambler, C. M. (1959). The Theory of Scaling up Laboratory Data for the Sedimentation Type Centrifuge. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(2), 185 – 205.
- ✓ Ashaye, O. A., Babalola, S. O., Babalola, A. O., Aina, J. O., & Fasoyiro, S. B. (2005). Chemical and organoleptic characterization of pawpaw and guava leathers. *World Journal of Agricultural Sciences*, 1(1), 50 – 51.
- ✓ Bekhouche, F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de

Doctorat d'Etat : Microbiologie et Enzymologie. République Algérienne Démocratique et Populaire : Université de Mentouri Constantine, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires.

- ✓ Bélafi-Bakó, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., & Gubicza, L. (2007). Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 438 – 442.
- ✓ Belitz H.-D., Grosch W., & Schieberle P. (2009). Carbohydrates. In: *Food Chemistry* 4th revised and extended edition, Belitz H.-D., Grosch W., & Schieberle P. (Eds) (pp. 248 – 339). Berlin Heidelberg Germany: Springer-Verlag.
- ✓ Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., & Visser, J. (1999). Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal Biochemistry*, 259(3), 577-585.
- ✓ Benen, J. A. E., van Alebeek G. J. W. M., Voragen, A. G. J., & Visser, J. (2003). Mode of action analysis and structure-function relationships of *Aspergillus niger* pectinolytic enzymes. In: Voragen F., Schols, H., & Visser, R. (Eds.) (2003). *Advances in Pectin and Pectinase Research* (pp. 235 – 256). The Netherlands: Springer-Science+Business Media, B.V.
- ✓ Bisswanger, H. (2008). Multiple equilibria. In: *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* 2nd edition, Bisswanger, H. (Ed), (pp. 7 – 58). Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- ✓ Bisswanger, H. (2008). Enzyme kinetics. In: *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* 2nd edition, Bisswanger, H. (Ed), (pp. 59 – 195). Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH.

- ✓ Blainski, A., Lopes, G. C., & Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, *18*, 6852 – 6865.
- ✓ Boychyn, M., Yim, S. S. S., Bulmer, M., More, J., Bracewell D. G., & Hoare, M. 2004. Performance prediction of industrial centrifuges using scale-down models. *Bioprocess Biosystem Engineering*, *26*, 385 – 391.
- ✓ Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30.
- ✓ Brudieux, V., 2007. Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure/activité à la dermocosmétique. Thèse de doctorat : Chimie appliquée – Chimie des Sciences Naturelles. Université de Limoges, Limoges.
- ✓ Cambiella, A., Benito, J. M., Pazos, C., & Coca, J. (2006). Centrifugal separation efficiency in the treatment of waste emulsified oils. *Chemical Engineering Research and Design*, *84*(A1), 69 – 76.
- ✓ Cárdenas, M. L. (2013). Michaelis and Menten and the long road to the discovery of cooperativity Review. *FEBS Letters*, *587*, 2767 – 2771.
- ✓ Chawafambira, A., Namalawa, S. T., & Augustine, M. (2015). Production and optimisation of mango juice clarification using a manually pressurised filter at medium scale level in Rusitu valley, Zimbabwe. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, *4*(5), 131 – 136.

- ✓ Chlup, P. H., Bernard, D., & Stewart, G. G. (2008). Disc Stack Centrifuge Operating Parameters and Their Impact on Yeast Physiology. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 45 – 61.
- ✓ Chopda, C. A., & Barrett, D. M. (2001). Optimization of guava juice and powder production. *Journal of Food Processing Preservation*, 25, 411 – 430.
- ✓ Combo, A. M. M., Aguedo, M., & Paquot, M. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnological Agronomic Social Environment*, 15 (1), 153 – 164.
- ✓ Combo, A. M. M., Aguedo, M., Goffin, D., Wathelet, B., & Paquot, M. (2012). Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 588–596.
- ✓ Cornish-Bowden, A. (2013). The origins of enzyme kinetics: Review. *FEBS Letters*, 587, 2725 – 2730.
- ✓ Da Silva Cerqueira Leite, K. M., Tadiotti, A. C., Baldochi, D., & Oliveira, O. M. M. F. (2006). Partial purification, heat and kinetic characterization of pectinmethylesterase from Brazilian guava, Paluma cultivars. *Food Chemistry*, 94, 565 – 572.
- ✓ Dahlstrom, D. A., Bennett, R. C., Emmett, Jr. R. C., Harriot, P., Laros, T., Leung, W., McCleary, C., Miller, S. A., Morey, B., & Oldshue, J. Y. (Eds). (1999). Liquid-solid operations and equipment. In Perry, R. H., Green, D. W., & Maloney, J. O. (Eds) (1999). *Perry's Chemical Engineers Handbook* (Seventh Edition) (Section 18, pp. 18-106 – 18-125). USA: McGraw-Hill Book Company, Inc.

- ✓ Das, A., & Majumdar, K. (2010). Fractional changes of pectic polysaccharides in different tissue zones of developing guava (*Psidium guajava* L.) fruits. *Scientia Horticulturae*, 125, 406–410.
- ✓ Dennison, C. (2002). Assay, Extraction and sub-cellular fractionation. In: *A Guide to Protein Isolation*, Dennison, C. (Ed) (pp. 8 – 40). USA: Kluwer Academic Publishers.
- ✓ Deo, A., & Shastri, N. V. (2003). Purification and characterization of polygalacturonase-inhibitory proteins from *Psidium guajava* Linn. (guava) fruit. *Plant Science*, 164, 147 – 156.
- ✓ Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 167, 189 – 198.
- ✓ Do Amaral, S. H., De Assis S. A., & De Faria Oliveira, O. M. M. (2005). Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) cv. Pera-Rio. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 367 – 380.
- ✓ Domingues, R. C. C., Faria Junior, S. B., Silva, R. B., Cardoso, V. L., & Reis, M. H. M. (2012). Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. *Process Biochemistry*, 47, 467–471.
- ✓ Espuny Garcia del Real, G. (2016). *Scale-down characterisation of post-centrifuge flocculation processes and the study of its impact upon downstream processing during mammalian cell antibody production*. Thesis submitted for the degree of Doctor of Engineering, University College London, Londres.

- ✓ Flores, G., Wu, S. B., Negrin, A., & Kennelly, E. J. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*, *170*, 327 – 335.
- ✓ Flottweg, sd. Les séparateurs à assiettes Flottweg : Technologie innovante de séparation solide/liquide. Flottweg Separation Technology, Vilsbiburg, Allemagne. pp. 1 – 12.
- ✓ Flottweg, sd. Technologie Innovante des Décanteurs Centrifuges. Flottweg Separation Technology, Vilsbiburg, Allemagne. pp. 1 – 24.
- ✓ Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries: Review Article. *Biotechnology*, *6* (47), 1 – 13.
- ✓ Goulao, L. F., & Oliveira, C. M. (2008). Cell wall modifications during ripening: when a fruit is not the fruit. Review. *Trends in Food Science and Technology*, *19*, 4 – 25.
- ✓ Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., & Maire, P. (2008). The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. Review Article. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *22*, 633 – 648.
- ✓ Gummadi, S. N., & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. *Process biochemistry*, *38*, 987 – 996.
- ✓ Harholt, J., Suttangkakul, A., & Scheller, H. V. (2010). Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, *153*, 384 – 395.
- ✓ Hassan, I., Khurshid, W., & Iqbal K. (2012). Factors responsible for decline in guava (*Psidium guajava*) yield. *Journal of Agricultural Resources*. *50*(1), 129 – 134.

- ✓ Holvik, H., & Høiland, H. (1977). Acidity constants of galacturonic and glucuronic acids in water at 298.15 K from conductance and e.m.f. measurements. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 9(4): 345 – 348.
- ✓ Höln, A., Sun, D., & Nolle, F. (2005). Enzymes in the fruit juice and wine industry. In: Barrett, D. M., Somogyi L., & Ramaswamy, H. (Eds) (2005). *Processing Fruits: Science and Technology*, Second Edition (pp. 97 – 112). USA: CRC PRESS Inc.
- ✓ Howell, J. T., & Davis, M. R. (2005). Plant defense mechanisms against fungal pathogens: polygalacturosase inhibitor proteins. *Canadian Journal Plant Pathology*, 27, 5 – 15.
- ✓ Iglesias, M. T., & Lozano, J. E. (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62, 215 – 223.
- ✓ International Oenological Codex (2012). Determination of polygalacturonase activity in enzymatic preparations. En ligne <http://www.oiv.int/public/medias/4352/e-coei-1-actpga-en.pdf>, consulté le 03 aout 2016.
- ✓ Jain, A., & De, S. (2016). Aqueous extraction of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) juice and optimization of operating conditions. *Fruits*, 71(6), 379 – 387.
- ✓ Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S. P., Siddiqui, S., & Singh, R. (2001). Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(3), 357 – 362.
- ✓ Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, 2931 – 2944.
- ✓ Jimenez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(11), 5489 – 5493.

- ✓ Jukkola, A., Hokkanen, S., Kämäräinen, T., Partanen, R., Heino, A., & Rojas, O. J. (2018). Changes in milk fat globules and membrane lipids under the shear fields of microfiltration and centrifugation. *Journal of Membrane Science*, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.12.007>.
- ✓ Kaur, S., Sarkar, B. C., Sharma, H. K., & Singh, C. (2009). Optimization of Enzymatic Hydrolysis Pretreatment Conditions for Enhanced Juice Recovery from Guava Fruit Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 96 – 100.
- ✓ Kaur, S., Sarkar, B. C., Sharma, H. K., & Singh, C. (2011). Response surface optimization of conditions for the clarification of guava fruit juice using commercial enzyme. *Journal of Food Process Engineering*, 34(4), 1298 – 1318.
- ✓ Kiss, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L., & Bélafi-Bakó, K. (2009). Vacuum assisted membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of pectin from various agro-wastes. *Desalination*, 241, 9 – 33.
- ✓ Koller, E. (2009). Sédimentation et décantation. Dans : *Aide-mémoire Génie chimique*, 3^e Edition (pp. 71 – 98). Dunod, Paris : L'usine Nouvelle.
- ✓ Koubala, B. B., Mbome, L. I., Kansci, G., Tchouanguep Mbiapo F., Crepeau, M.-J., Thibault, J.-F., & Ralet M.-C. (2008). Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, 106, 1202 – 1207.
- ✓ Le, T. T., Nguyen, V. P. T., & Le, V. V. M. (2012). Application of cellulose preparation to guava mash treatment in juice processing: optimization of treatment conditions by RSM. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 5(04), 284 – 291.

- ✓ Lee, W. C., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Baharin, B. S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, 73(1), 55–63.
- ✓ Leskovac, V. (2003). Cooperative and allosteric effects. In: *Comprehensive enzyme kinetics*, Leskovac, V. (Ed), (pp. 243 – 282). New-York: Kluwer Academic Publishers.
- ✓ Liew Abdullah, A. G., Sulaiman, N. M., Aroua, M. K., & Megat Mohd Noor, M. J. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 65–71.
- ✓ Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- ✓ Malvern Instruments (2013). Zetasizer nano series, User manual. Malvern Instruments Ltd, Worcs, Grande Bretagne. pp. 1 – 250.
- ✓ Marangoni, A. G. (2003). Multisite and cooperative enzymes. In: *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, Maragoni, A. G. (Ed) (pp. 102 – 115). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- ✓ Marcelin, O., Smith, A. B., Bonnin, E., & Billouet J.-M. (2017). Enzymatic breakdown of cell wall polysaccharides of guava (*Psidium guajava* L.) puree. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 11(3), 14 – 23.
- ✓ Masmoudi, M., Besbes, S., Chaabouni, M., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2008). Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 185–192.

- ✓ Maybury, J. P., Hoare, M., & Dunnill, P. (2000). The Use of Laboratory Centrifugation Studies to Predict Performance of Industrial Machines: Studies of Shear-Insensitive and Shear-Sensitive Materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(3), 265 – 273.
- ✓ McComb, E. A., & McCready, R. M. (1952). Colorimetric determination of pectic substances. *Analytical Chemistry*, 24(10), 1630-1632.
- ✓ McLellan, M. R., & Padilla-Zakour, O. I. (2005). Juice Processing. In: Barrett, D. M., Somogyi L., & Ramaswamy, H. (Eds) (2005). *Processing Fruits: Science and Technology*, Second Edition (pp. 73 – 96). USA: CRC PRESS Inc.
- ✓ Minzanova, S.T., Mironov, V. F., Arkhipova, D. M., Khabibullina, A. V., Mironova, L. G., Zakirova, Y. M., & Milyukov, V. A. (2018). Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review. *Polymers*, 10, 1 – 31.
- ✓ Nag, A. R., Chatterjee, D. D., Roy, T., Hossain, A. M. M. Z., & Azizul Haque Md. (2011). Study on chemical changes of different guava varieties during different ripening stage. *Bangladesh Research Publications Journal*, 6(2), 217 – 224.
- ✓ Nguyen, V. P. T., Le, T. T., & Le, V. V. M. (2013). Application of combined ultrasound and cellulase preparation to guava (*Psidium guajava*) mash treatment in juice processing: optimization of biocatalytic conditions by response surface methodology. *International Food Research Journal*, 20(1), 377 – 381.
- ✓ Nikolić Milos V., & Mojovic, L. (2007). Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectin enzymes. *Food Chemistry*, 101, 1 – 9.
- ✓ Nithya, P., & Madhavi, C. (2017) Antioxidant activity of 3 – arylidene – 4 -piperifdone in 1,1 – diphenyl – 2 – picrylhydrazyl scavenging assay. *Journal of Taibah Univerity for Sciences*, 11, 40 – 45.

- ✓ Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Quantification of Protein. In: Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (Eds) (2009). *Methods in enzymology*, Volume 463, *Guide to Protein Purification*, 2nd Edition (pp. 73 – 96). USA: Elsevier.
- ✓ Nso, E. J., Ndibewu, P, & Kayem, G. J. (1998). Reduction of viscosity of guava pulps by treatment with pectinases. *Cameroon Journal of Biological and Biochemical Sciences*, 8(1), 7 – 16.
- ✓ Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Anthony, S. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya, pp. 1 – 5.
- ✓ Pagán, J., & Ibarz, A. (1999). Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *Journal of Food Engineering*, 39, 193 – 201.
- ✓ Pagán, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagán, A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2001). Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, 34, 605 – 612.
- ✓ Pařenicová, L., Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., & Visser J. (1998). pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 251(1-2), 72 – 80.
- ✓ Pařenicová, L., Kester, H. C. M., Benen, J. A. E, & Visser J. (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS Letters*, 467(2-3), 333 – 336.
- ✓ Paull, R. E., & Bittenbender H. C. (2008). *Psidium guajava* Guava. In: Jules, J., & Robert, E. P. (Eds) (2008). *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*, First Edition (pp. 541 - 548). Cambridge: CABI Publishing.

- ✓ Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85, 109 – 121.
- ✓ Phani Deepthi, V., & Chandra Sekhar, R. (2015). Post harvest physiological and biochemical changes in guava (cv. LUCKNOW – 49) fruits harvested at two stages of maturity during low temperature storage. *International Journal of Processing and Post Harvest Technology*, 6(2), 128-143.
- ✓ Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25 – 39.
- ✓ Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena- an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 1 – 19.
- ✓ Prinz, H. (2010). Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *Journal of Chemical Biology*, 3, 37 – 44.
- ✓ Rai, P., Majumdar, G. C., DasGupta, S., & De, S. (2004). Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 397–403.
- ✓ Ralet, M.-C., Cabrera, J. C., Bonnin, E., Quéméner, B., Pilar, H., & Thibault, J.-F. (2005). Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, 66, 1832 – 1843.
- ✓ Rayat, A. C. M. E., Chatel, A., Hoare, M., & Lye, G. J. (2016). Ultra scale-down approaches to enhance the creation of bioprocesses at scale: impacts of process shear stress and early recovery stages. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 14, 150 – 157.

- ✓ Razzaque, M. A., Saud, Z. A., Asbar, N., Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2000). Purification and Characterization of Polyphenoloxidase from Guava Infected with Fruit-rot Disease. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3(3), 407 – 410.
- ✓ Richardson, J. F., & Harker, J. H. (2002). Centrifugal separations. In: Couldson and Richardson's *Chemical engineering Volume 2, Fifth Edition, Particle technology and separation processes*. (pp. 475 – 501). Oxford: Butterworth-Heinemann.
- ✓ Robatel, M., & Borel, P. (1989). Centrifugation – Généralités, Théorie. *Technique de l'Ingénieur*, p2845, Traité Génie des Procédés, pp. 1 – 20.
- ✓ Robatel, M., & Borel, P. (1989). Centrifugation - Technologie. *Technique de l'Ingénieur*, p2845, Traité Génie des Procédés, pp. 1 – 18.
- ✓ Robinson, P. K. (2015). Enzyme: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1 – 41.
- ✓ Rupainwar, R., Pandey J., Smriti, & Ruchi (2019). The Importance and Applications of Knoevenagel Reaction (Brief Review). *Oriental Journal of Chemistry*, 35(1), 423 – 429.
- ✓ Sagu, S. T., Nso, E. J., Karmakar, S., & De, S. (2014). Optimisation of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. *Food Chemistry*, 151, 182–190.
- ✓ Sagu, S. T., Nso, E. J., Karmakar, S., & De, S. (2014). Primary Clarification of Banana Juice Extract by Centrifugation and Microfiltration. *Separation Science and Technology*, 49, 1156 – 1169.
- ✓ Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., Escobedo-García, S., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Analytical methods for pectin methylesterase activity determination: a Review. *Food Analytical Methods*, 10, 3634 – 3646.

- ✓ Salte, H., King, J. M. P., Baganz, F., Hoare, M., & Titchener-Hooker, N. J. (2006). A Methodology for Centrifuge Selection for the Separation of High Solids Density Cell Broths by Visualisation of Performance Using Windows of Operation. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6), 1218 – 1227.
- ✓ Shekhawat, L. K., Sarkar, J., Gupta, R., Hapde, S., & Rathore, A. S. (2018). Application of CFD in Bioprocessing: Separation of mammalian cells using disc stack centrifuge during production of biotherapeutics. *Journal of Biotechnology*, 267, 1 – 11.
- ✓ Shomer, I., Yefremov, T., & Merin, U. (1999). Involvement of proteins in cloud instability of Shamouti orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 2623 – 2631.
- ✓ Sidhu, J. S. (2012). Tropical fruit II: production, processing and quality of guava, lychee, and papaya. In: Sinha, N. K., Sidhu, J. S., Barta, J., Wu, J. S. B., & Pilar Cano, M. (Eds) (2012). *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Second Edition (pp. 565 – 589). USA: John Wiley & Sons, Inc.
- ✓ Siebert, K. J. (1999). Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 353 – 362.
- ✓ Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A review. *Silpakorn University International Journal*, 3, 206 – 228.
- ✓ Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. (2009). Buffers: principles and practice. In: Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (Eds) (2009). *Methods in enzymology* Volume 463, *Guide to Protein Purification* 2nd Edition (pp. 43 – 56). USA: Elsevier.

- ✓ Sundar Raj, A. A., Rubila, S., Jayabalan, R., & Ranganathan, T. V. (2012). A Review on pectin: chemistry due to general properties of pectin and its pharmaceutical uses. 1:550 doi:10.4172/scientificreports.550.
- ✓ Surajbhan, S., Singh, A., Joshi, C., & Rodrigues, L. (2012). Extraction and optimization of guava juice by using response surface methodology. *American Journal of Food Technology*, 7(6), 326–339.
- ✓ Svarovsky, L. (2000). Separation by centrifugal sedimentation. In: *Solid – Liquid Separation* (Fourth Edition) (pp. 246 – 280). Oxford: Butterworth – Heinemann.
- ✓ Tapre, A. R., & Jain, R. K. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry Mini Review. *International Food Research Journal*, 21(2), 447 – 453.
- ✓ Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi M. M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects: Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1 – 16.
- ✓ Teixeira, G. H. A., Cunha Júnior, L. C., Ferraudo, A. S., & Durigan, J. F. (2016). Quality of guava (*Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato) fruit stored in low-O₂ controlled atmospheres is negatively affected by increasing levels of CO₂. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 62–68.
- ✓ Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating Antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.
- ✓ Thermo Fischer Scientific, (2009). Convert between times gravity (xg) and centrifuge rotor speed (RPM). Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA. Pp. 1.

- ✓ Towler, G., & Sinnott, R. (2008). Equipment Selection, Specification, and Design. In: Couldson and Richardson's *Chemical Engineering Volume 6, CHEMICAL ENGINEERING DESIGN (Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design)*. (pp. 541 – 639). London: Butterworth-Heinemann.
- ✓ Trindade, L. V., Desagiaco, C., de Moraes Polizeli, M. de L. T., de Lima Damasio, A. R., Furuama Lima, A. M., Gomes, E., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2016). Biochemical characterization, thermal stability, and partial sequence of a novel exo-polygalacturonase from the Thermophilic Fungus *Rhizomucor pusillus* A13.36 obtained by submerged cultivation. Research Article. *BioMed Research International*. 2016, 1 – 10.
- ✓ Uhlig, H. (1998). General characteristics of technical enzymes. In: *Industrial enzymes and their applications*, Uhlig, H. (Ed) (pp. 13 – 36). USA: John Wiley and Sons, Inc.
- ✓ Ümit Ünal, M., & Bellur, E. (2009). Extraction and characterization of pectin (*Daucuscarota* L). *Food Chemistry*, 116, 836 – 840.
- ✓ USDA (2004). National nutrient database for standard reference, Release 16 -1.
- ✓ United States Agency International Development (USAID) (2014). The US Market for Processed Guava. En ligne <http://www.usaid-acceso.org>, consulté le 13 octobre 2017.
- ✓ Van Dijk, C., Boeriu, C., Stolle-Smits T., & Tijssens, L. M. M. (2006). The firmness of stored tomatoes (*cv. Tradiro*). 2. Kinetic and Near Infrared models to describe pectin degrading enzymes and firmness loss. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 585 – 593.
- ✓ Van Jaarsveld, F. P., Blom, M., Hattingh, S., & Marais, J. (2005). Effect of juice turbidity and yeast lees content on brandy base wine and unmaturred pot-still brandy quality. *South African Journal of Enology and viticulture*, 26(2), 116 – 130.

- ✓ Van Pouderooyen, G., Snijder, H. J., Benen, J. A. E., & Dijkstra, B. W. (2003). Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters*, 554(3), 462 – 466.
- ✓ Van Santen, Y., Benen, J. A. E., Schröter, K.-H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser J., & Dijkstra, B. W. (1999). 1.68-Å Crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30474 – 30480.
- ✓ Vincken, J.-P., Schols; H. A., Oomen, R. J. F. J., Beldman, G., Visser, R. G. F., & Voragen, A. G. J. (2003). Pectin – The Hairy Thing. *Evidence that homogalacturonan is a Side Chain of rhamnogalacturonan I*. In: Voragen, F., H. Schols, H., & Visser, R. (Eds.). (2003). *Advances in Pectin and Pectinase Research* (pp. 47 – 59). The Netherlands: Springer-Science+Business Media, B.V.
- ✓ Wang, Q., Fan, X., Hua, Z., Gao, W., & Chen, J. (2007). Degradation kinetics of pectins by an alkaline pectinase in bioscouring of cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, 67, 572 – 575.
- ✓ Weiss, J. N. (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.*, 11, 835 – 841.
- ✓ Willats, W. L. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9 – 27.
- ✓ Wu, J. S.-B., Wu, M.-W., & Wei, Y.-P. (2005). Tropical Fruits. In: Barrett, D. M., Somogyi L., & Ramaswamy, H. (Eds) (2005). *Processing Fruits: Science and Technology*, Second Edition (pp. 679 – 705). USA: CRC PRESS.

- ✓ Yamashiro, S., Noguchi, K., Matsuzaki, T., Miyagi, K., Nakasone, J., Sakanashi, M., Sakanashi, M., Kukita, I., Aniya, Y., & Sakanashi, M. (2003). Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L and *Limonium wrightii*, Okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. *Pharmacology*, 67(3), 128–135.
- ✓ Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361 – 442.

Sites internet consultés

- ✓ www.worthlington-biochem.com, consulté le 21 novembre 2018.

ANNEXES

ANNEXE 1: Images de la goyave

ANNEXE 2 : Données de la dégradation de la pectine commerciale

ANNEXE 3 : Données de la dégradation de la pectine de goyave

ANNEXE 4 : Données du traitement enzymatique de la purée de goyave

ANNEXE 5 : Images de jus de goyave à chair blanche traité et clarifié

ANNEXE 6 : Données de centrifugation

ANNEXE 1 : Images de la goyave



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figure 1 : Images de goyaves. (a) et (b) goyaves entière et tranchée, respectivement. (c), (d) et (e) goyaves mures entière et tranchées, respectivement.

ANNEXE 2 : Données de la dégradation de la pectine commerciale

Tableau 1 : Cinétique de dégradation de la pectine commerciale

N°	Concentration en pectine commerciale ([S]) (mg/L)	Vitesse moyenne de réaction (V) ($\mu\text{mol/L/min}$) ($\cdot 10^{-3}$)
0	0	0 ^a
1	300	3,40 \pm 0,33 ^b
2	500	4,65 \pm 0,36 ^c
3	900	7,44 \pm 0,28 ^d
4	1100	8,52 \pm 0,37 ^e
5	1500	10,68 \pm 0,83 ^f
6	1700	10,42 \pm 0,37 ^f
7	1900	10,79 \pm 0,29 ^f

ANNEXE 3 : Données de la dégradation de la pectine de goyave

Tableau 2 : Analyse des variances pour le taux d'hydrolyse de la pectine (%)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a
3	11,1430±6,7806 ^b	20,0000±1,0386 ^b	27,8048±0,2577 ^b	67,1536±1,6852 ^b
5	16,8317±6,9913 ^{bc}	29,1165±1,3067 ^c	35,4735±4,4974 ^c	67,8736±1,0282 ^b
8	19,0000±3,0146 ^c	35,0000±2,1573 ^d	38,0701±6,3221 ^{cd}	70,0996±1,9276 ^c
12	20,0000±0,1944 ^c	41,9566±0,8641 ^e	44,9465±6,9000 ^d	70,7064±0,8572 ^{cd}
15	21,0000±0,452 ^c	50,1638±4,3525 ^f	53,5317±2,9766 ^e	71,3774±1,7592 ^{cd}
18	21,4462±7,5873 ^c	58,0153±1,0124 ^g	62,0100±3,4669 ^f	72,2579±0,1347 ^d
20	24,0401±0,0000 ^c	66,7898±3,9777 ^h	68,9613±0,2528 ^g	76,6699±0,4662 ^e
40	45,8371±0,0000 ^d	74,0320±2,4010 ⁱ	74,8707±0,6487 ^h	80,2063±0,3899 ^f
60	55,5411±6,9696 ^e	75,0812±1,6056 ⁱ	78,7324±0,4478 ^{hi}	81,2688±1,3651 ^{fg}
80	62,5438±5,1944 ^{ef}	75,0307±1,8136 ⁱ	79,5694±0,2080 ^{hi}	82,3143±0,6914 ^g
90	63,8249±0,9152 ^f	76,9339±0,8871 ⁱ	80,8390±1,4609 ⁱ	85,3734±8,7037 ^h
F	72,87	574,76	175,77	1267,67
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 4 : Données du traitement enzymatique du jus de goyave

Tableau 3 : Analyse des variances pour le pH

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	3,70±0,02 ^c	3,70±0,02 ^d	3,70±0,02 ^f	3,70±0,02 ^c
3	3,51±0,01 ^{ab}	3,52±0,01 ^{bc}	3,52±0,02 ^{de}	3,48±0,01 ^{ab}
5	3,48±0,04 ^a	3,50±0,02 ^{abc}	3,49±0,01 ^{bc}	3,48±0,01 ^a
8	3,53±0,02 ^{ab}	3,52±0,03 ^c	3,52±0,02 ^e	3,49±0,03 ^{ab}
12	3,58±0,01 ^b	3,51±0,01 ^{bc}	3,45±0,01 ^a	3,45±0,01 ^{bc}
15	3,58±0,01 ^{ab}	3,50±0,01 ^{abc}	3,44±0,01 ^a	3,46±0,01 ^{bc}
18	3,50±0,17 ^{ab}	3,49±0,01 ^{abc}	3,45±0,01 ^a	3,47±0,02 ^{ab}
20	3,55±0,02 ^{ab}	3,52±0,01 ^{bc}	3,49±0,01 ^{cd}	3,49±0,01 ^{ab}
40	3,54±0,02 ^{ab}	3,51±0,04 ^{abc}	3,46±0,02 ^{ab}	3,47±0,01 ^{ab}
60	3,56±0,07 ^{ab}	3,48±0,05 ^{ab}	3,46±0,01 ^{abc}	3,47±0,01 ^{ab}
80	3,54±0,08 ^{ab}	3,47±0,03 ^a	3,45±0,01 ^a	3,44±0,00 ^{ab}
90	3,53±0,07 ^{ab}	3,49±0,01 ^{abc}	3,44±0,05 ^a	3,43±0,02 ^{ab}
F	2,46	19,24	41,68	73,14
Probabilité	0,0317	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 4 : Analyse des variances pour la conductivité électrique (mS/cm)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	1574,33±18,48 ^{abc}	1574,33±18,48 ^a	1574,33±18,48 ^a	1574,33±18,48 ^a
3	1605,67±13,65 ^{efg}	1630,00±6,24 ^c	1631,00±3,61 ^e	1634,00±30,05 ^{de}
5	1687,33±3,06 ^h	1672,67±13,43 ^d	1664,33±7,23 ^f	1651,00±15,72 ^e
8	1606,00±3,46 ^{bcde}	1626,67±2,08 ^{bc}	1630,00±12,29 ^e	1615,00±3,00 ^{abcd}
12	1620,67±21,78 ^g	1605,33±11,02 ^{bc}	1585,33±10,02 ^{ab}	1622,00±10,44 ^{cde}
15	1619,92±6,03 ^g	1612,33±13,65 ^{bc}	1573,00±7,21 ^a	1606,00±7,55 ^{abcd}
18	1614,33±15,31 ^{fg}	1595,50±7,78 ^{ab}	1586,33±3,51 ^{ab}	1605,67±2,31 ^{abcd}
20	1569,33±8,08 ^{ab}	1569,33±8,50 ^a	1611,00±6,24 ^{cd}	1577,00±21,70 ^{ab}
40	1564,50±3,54 ^a	1570,33±25,50 ^a	1602,67±10,79 ^{bc}	1580,67±30,66 ^{ab}
60	1585,50±7,78 ^{bcd}	1593,33±23,18 ^{ab}	1615,00±4,00 ^{cde}	1591,00±42,46 ^{abc}
80	1590,50±10,61 ^{cde}	1590,67±28,01 ^{ab}	1624,67±17,47 ^{de}	1615,33±21,59 ^{bcde}
90	1596,67±13,87 ^{def}	1595,67±14,64 ^{ab}	1589,00±19,80 ^{ab}	1585,67±39,32 ^{abc}
F	23,32	9,95	19,35	3,01
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0117

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 4 : Données du traitement enzymatique du jus de goyave à chair blanche (Suite)

Tableau 5 : Analyse des variances pour la teneur en sucres solubles totaux (°Brix)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	1,7±0,1 ^a	1,7±0,1 ^a	1,7±0,1 ^a	1,7±0,1 ^a
3	2,2±0,0 ^{bcd}	2,2±0,1 ^b	2,3±0,1 ^{ef}	2,2±0,1 ^{bc}
5	2,1±0,1 ^{bc}	2,2±0,0 ^b	2,2±0,0 ^{cdef}	2,2±0,0 ^c
8	2,1±0,0 ^b	2,2±0,0 ^b	2,2±0,0 ^{cdef}	2,1±0,0 ^{bc}
12	2,2±0,1 ^{bc}	2,2±0,1 ^b	2,2±0,1 ^{def}	2,1±0,1 ^{bc}
15	2,1±0,1 ^{bc}	2,2±0,1 ^b	2,1±0,1 ^{bcd}	2,0±0,1 ^b
18	2,1±0,0 ^b	2,2±0,0 ^b	2,2±0,0 ^{cdef}	2,2±0,1 ^c
20	2,2±0,2 ^{bcd}	2,2±0,2 ^b	2,2±0,1 ^{bcd}	2,2±0,3 ^c
40	2,2±0,1 ^{bc}	2,2±0,1 ^b	2,1±0,0 ^{bc}	2,1±0,1 ^{bc}
60	2,3±0,1 ^d	2,2±0,1 ^b	2,1±0,1 ^{bcd}	2,1±0,0 ^{bc}
80	2,2±0,1 ^{bcd}	2,2±0,2 ^b	2,3±0,1 ^f	2,1±0,1 ^{bc}
90	2,3±0,2 ^{cd}	2,2±0,1 ^b	2,1±0,1 ^b	2,2±0,0 ^c
F	10,19	3,70	17,68	6,97
Probabilité	0,0000	0,0036	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 6 : Analyse des variances pour la couleur (10* Absorbance)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	9,828±0,315 ^a	9,828±0,315 ^a	9,828±0,315 ^a	9,828±0,315 ^a
3	11,128±0,821 ^b	10,719±0,234 ^b	10,118±0,136 ^c	10,623±0,285 ^{bc}
5	11,712±0,047 ^b	11,326±0,726 ^{bc}	11,413±0,143 ^d	10,945±0,465 ^{cd}
8	11,237±0,154 ^b	11,594±0,228 ^{cd}	11,390±0,198 ^d	11,310±0,385 ^d
12	13,736±0,625 ^{cd}	12,184±0,399 ^{def}	9,720±0,202 ^a	10,848±0,512 ^{ab}
15	13,65±0,187 ^{cd}	12,131±0,137 ^{de}	10,162±0,045 ^c	10,724±0,627 ^{ab}
18	13,374±0,429 ^c	12,743±0,256 ^{efg}	9,882±0,856 ^{ab}	11, 528±1,488 ^{cd}
20	13,720±1,199 ^{cd}	12,040±0,429 ^{cde}	12,217±0,884 ^c	12,359±0,290 ^{ef}
40	13,637±0,782 ^{cd}	12,225±0,252 ^{def}	13,730±0,740 ^d	12,927±0,294 ^f
60	13,843±0,693 ^{cd}	12,896±0,424 ^{fg}	13,242±0,315 ^d	12,747±0,190 ^{ef}
80	13,843±0,071 ^{cd}	12,731±0,201 ^{efg}	13,334±0,267 ^d	12,569±0,171 ^{ef}
90	14,441±0,669 ^d	13,062±0,827 ^g	13,399±0,509 ^d	12,294±0,341 ^e
F	16,36	15,72	33,52	21,28
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 4 : Données du traitement enzymatique du jus de goyave à chair blanche (Suite)

Tableau 7 : Analyse des variances pour la teneur en protéine (mg/L)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	615,681±28,575 ^d	615,681±28,575 ^f	615,681±28,575 ^f	615,681±28,575 ^f
3	563,615±43,223 ^{bc}	574,789±18,524 ^{de}	443,408±20,343 ^{de}	552,723±46,586 ^{de}
5	575,274±23,680 ^{bc}	574,163±7,293 ^{de}	524,648±22,574 ^{de}	460,092±26,643 ^b
8	542,926±35,386 ^b	554,804±11,377 ^{de}	496,338±9,163 ^{de}	410,688±44,189 ^a
12	479,984±26,714 ^a	585,822±15,603 ^f	527,700±40,368 ^f	505,305±5,312 ^{bc}
15	481,08±4,614 ^a	578,732±6,772 ^e	506,808±40,368 ^e	584,883±78,744 ^{ef}
18	468,013±19,612 ^a	579,225±1,759 ^e	476,066±11,913 ^e	545,235±26,674 ^{cde}
20	588,357±61,308 ^{cd}	473,350±12,566 ^a	548,983±19,108 ^a	545,376±7,602 ^{de}
40	529,374±36,384 ^{bc}	516,244±14,190 ^{bc}	579,624±16,998 ^{bc}	559,390±13,116 ^{bc}
60	547,066±48,244 ^b	544,319±14,209 ^{cd}	528,185±38,847 ^{cd}	533,873±25,728 ^{bcd}
80	540,203±11,367 ^b	551,972±35,365 ^{cd}	541,455±15,190 ^{de}	549,578±3,519 ^{bcd}
90	592,300±18,591 ^{cd}	511,878±6,735 ^b	514,883±20,345 ^b	540,047±17,462 ^b
F	9,68	9,60	7,73	6,50
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 8 : Analyse des variances pour la teneur en polyphénol (mgGAE/100mL)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	60,389±0,405 ^e	60,389±0,405 ^g	60,389±0,405 ^e	60,389±0,405 ^f
3	53,301±3,796 ^{cd}	52,318±1,497 ^{def}	40,444±1,043 ^a	48,788±1,149 ^{bcd}
5	51,358±3,246 ^{bcd}	50,725±1,231 ^{cde}	47,851±4,883 ^{cd}	48,222±3,292 ^{bc}
8	48,266±3,365 ^{abc}	50,224±0,786 ^{bcd}	46,104±0,661 ^{bc}	42,145±0,292 ^a
12	58,651±0,839 ^e	54,753±1,638 ^{ef}	48,064±2,497 ^{cd}	53,775±2,116 ^e
15	57,240±0,536 ^{de}	55,168±2,204 ^f	50,563±1,674 ^d	53,781±1,173 ^e
18	56,024±1,084 ^{abc}	54,428±0,553 ^{ef}	42,150±2,496 ^{ab}	52,071±2,440 ^{de}
20	49,499±1,333 ^a	45,178±3,802 ^a	44,149±3,479 ^{abc}	50,150±0,877 ^{bcd}
40	45,737±4,797 ^{abc}	47,207±4,431 ^{abc}	44,938±4,080 ^{bc}	49,783±2,117 ^{bcd}
60	48,996±3,663 ^{ab}	47,454±2,974 ^{abc}	41,957±0,924 ^{ab}	50,491±2,021 ^{bcd}
80	47,714±2,498 ^{ab}	46,191±2,370 ^{ab}	44,880±2,772 ^{bc}	50,717±1,325 ^{cde}
90	47,200±4,905 ^{de}	45,921±3,208 ^a	44,918±1,623 ^{bc}	46,988±4,746 ^b
F	8,25	11,20	12,28	12,12
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 4 : Données du traitement enzymatique du jus de goyave à chair blanche (Suite)

Tableau 9 : Analyse des variances pour la capacité antioxydante (%)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	94,671±0,325 ^d	94,671±0,325 ^b	94,671±0,325 ^f	94,671±0,325 ^c
3	91,929±0,546 ^a	94,320±0,446 ^{ab}	93,304±0,523 ^{cd}	93,117±0,787 ^{ab}
5	92,628±0,777 ^{ab}	93,255±1,054 ^a	94,187±0,874 ^{def}	93,468±0,344 ^b
8	92,727±0,135 ^{abc}	93,976±0,338 ^{ab}	91,104±0,714 ^a	92,350±0,373 ^a
12	94,427±0,518 ^d	93,779±0,245 ^{ab}	91,104±0,714 ^a	93,004±0,473 ^{ab}
15	94,700±0,502 ^d	94,252±0,050 ^{ab}	92,595±0,687 ^{bc}	92,616±0,803 ^{ab}
18	93,474±1,512 ^{abcd}	94,538±0,094 ^b	91,698±0,866 ^{ab}	92,617±0,594 ^{ab}
20	93,986±1,419 ^{bcd}	94,079±0,894 ^{ab}	94,262±0,498 ^{def}	95,264±0,272 ^d
40	94,002±2,159 ^{bcd}	94,359±0,876 ^{ab}	94,398±0,568 ^{ef}	95,669±0,430 ^{cd}
60	93,582±0,536 ^{abcd}	94,333±0,421 ^{ab}	93,975±0,271 ^{def}	95,340±0,099 ^{cd}
80	93,961±0,445 ^{bcd}	94,063±0,191 ^{ab}	93,477±0,654 ^{cde}	94,734±0,853 ^{cd}
90	94,355±0,841 ^{cd}	94,513±1,394 ^b	93,833±0,218 ^{def}	95,038±0,884 ^{cd}
F	2,36	1,01	13,22	14,18
Probabilité	0,0380	0,4661	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 10 : Analyse des variances pour la viscosité apparente (mPa.s)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	15,90±0,52 ^b	15,90±0,52 ^b	15,90±0,52 ^b	15,90±0,52 ^b
3	1,32±0,14 ^a	1,14±0,02 ^a	1,14±0,05 ^a	1,15±0,02 ^a
5	1,18±0,02 ^a	1,11±0,01 ^a	1,14±0,04 ^a	1,18±0,01 ^a
8	1,23±0,05 ^a	1,09±0,02 ^a	1,15±0,02 ^a	1,20±0,03 ^a
12	1,13±0,06 ^a	1,13±0,04 ^a	1,12±0,05 ^a	1,19±0,03 ^a
15	1,15±0,03 ^a	1,10±0,08 ^a	1,13±0,03 ^a	1,14±0,04 ^a
18	1,19±0,11 ^a	1,09±0,05 ^a	1,13±0,02 ^a	1,12±0,07 ^a
20	1,19±0,13 ^a	1,02±0,02 ^a	1,15±0,12 ^a	1,02±0,01 ^a
40	1,17±0,10 ^a	1,00±0,02 ^a	1,12±0,05 ^a	1,01±0,03 ^a
60	1,13±0,10 ^a	1,06±0,08 ^a	1,15±0,13 ^a	0,97±0,01 ^a
80	1,07±0,03 ^a	0,99±0,04 ^a	1,08±0,01 ^a	0,97±0,03 ^a
90	1,27±0,04 ^a	1,07±0,08 ^a	1,22±0,07 ^a	0,97±0,01 ^a
F	1853,10	2215,43	2058,24	2330,66
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 4 : Données du traitement enzymatique du jus de goyave à chair blanche (Suite)

Tableau 11 : Analyse des variances pour la teneur en acide galacturonique (mg/L)

Temps de contact (min)	Concentration en enzyme (% m/m)			
	0,033	0,055	0,078	0,100
0	5161,515±215,461 ^a	5161,515±216,461 ^a	5161,515±216,461 ^a	5161,515±216,461 ^a
3	4978,422±125,431 ^a	6671,090±333,979 ^{bc}	6124,237±817,280 ^{bc}	7717,979±60,318 ^b
5	6130,800±791,625 ^{bc}	6620,298±236,056 ^{bc}	6678,287±204,678 ^{bc}	7990,365±18,676 ^b
8	5993,487±542,526 ^b	6744,733±89,005 ^{bc}	6036,912±595,861 ^b	7893,998±248,843 ^b
12	6289,627±170,906 ^{bc}	7244,532±68,142 ^d	6681,678±84,630 ^{bc}	7920,826±282,241 ^b
15	6380,204±403,052 ^{bc}	6997,964±157,904 ^{bc}	6676,285±111,413 ^{bc}	7801,081±193,745 ^b
18	6510,716±218,516 ^{bc}	6555,806±23,219 ^b	6845,859±267,177 ^c	7686,333±447,969 ^b
20	6293,662±113,882 ^{bc}	7354,267±191,139 ^d	10418,670±1197,197 ^d	11136,353±67,628 ^c
40	6622,238±120,129 ^c	8155,887±321,768 ^e	11656,965±243,284 ^e	12394,028±13,170 ^{de}
60	6509,105±600,467 ^{bc}	7934,906±475,533 ^e	11622,359±870,634 ^e	12203,250±539,246 ^d
80	7349,988±40,221 ^d	8925,790±723,616 ^f	12837,247±306,107 ^f	12674,029±359,319 ^e
90	7405,359±127,782 ^d	9534,497±244,351 ^g	12304,428±1066,034 ^{ef}	13392,718±529,280 ^f
F	9,68	9,60	7,73	6,50
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 5 : Images de jus de goyave à chair blanche traité et clarifié

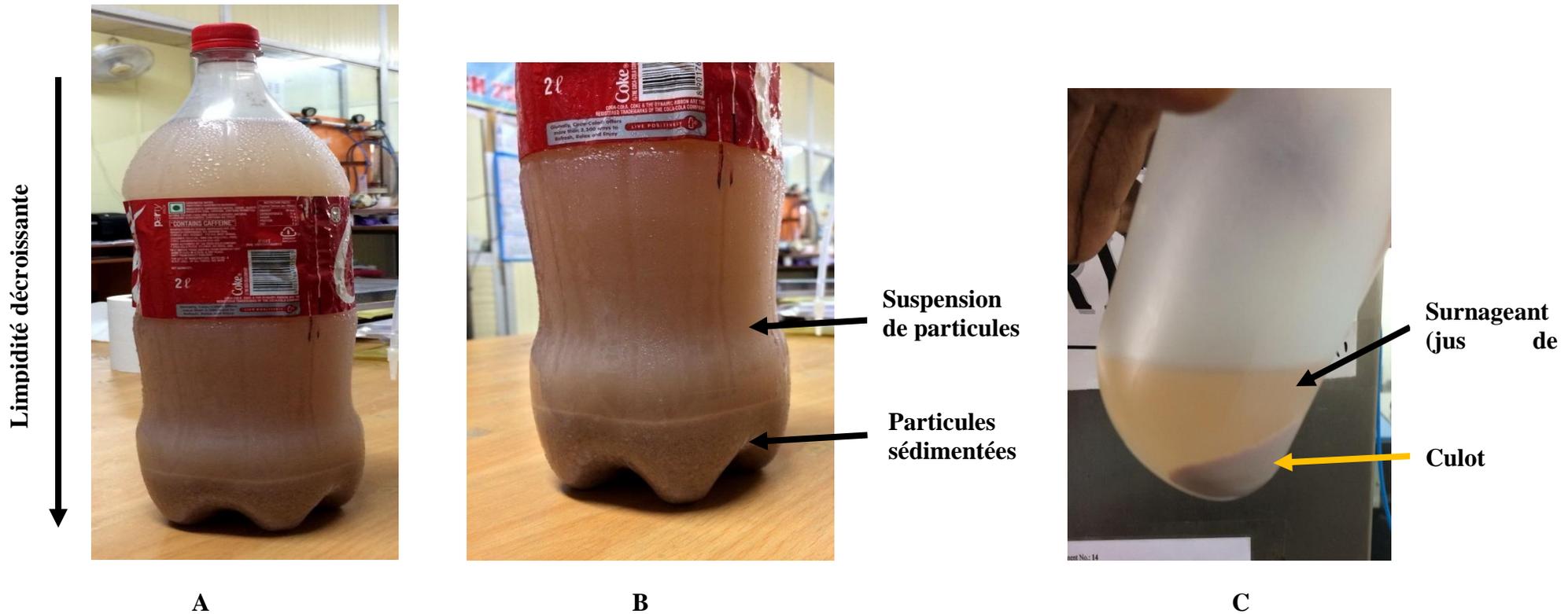


Figure 2 : Images des échantillons de jus de goyave. A : Mise en évidence de la diminution de la limpidité du jus de goyave à chair blanche en fonction des différents profils de sédimentation ; B : Formation d'un dépôt de particules au fond du récipient ; C : Formation du culot et apparition du jus de goyave à chair blanche après centrifugation.

ANNEXE 6 : Données de centrifugation

Tableau 12 : Analyse des variances pour la teneur en acide galacturonique (mg/L)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	7860,6900±244,09 ^{ab}	7860,6900±244,09 ^{bc}	7860,6900±244,09 ^a	7860,6900±244,09 ^a	7860,6900±244,09 ^b
10	7663,5499±164,39 ^a	7119,0173±25,77 ^a	7618,5787±301,50 ^a	7547,3148±399,06 ^a	7895,4254±59,13 ^b
20	8092,3828±211,95 ^b	7768,8397±25,77 ^{bc}	7550,0511±301,50 ^a	7653,1994±399,06 ^a	7541,7231±59,13 ^{ab}
30	8030,9340±164,39 ^b	7636,9003±108,39 ^b	7628,2154±301,50 ^a	7599,1864±257,64 ^a	7798,2257±59,13 ^b
40	7807,5055±97,79 ^{ab}	7971,9241±108,39 ^c	7863,1841±41,98 ^a	7598,4725±257,64 ^a	7040,2185±591,91 ^a
F	0,42	1,63	0,22	0,18	1,03
Probabilité	0,792	0,2427	0,9232	0,9429	0,4384

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 13 : Analyse des variances pour la limpidité (% Transmittance)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
10	0,00±0,00 ^a	0,05±0,01 ^a	5,46±1,65 ^b	29,28±0,66 ^b	44,75±1,65 ^b
20	0,00±0,00 ^a	2,58±0,01 ^b	25,98±1,65 ^c	47,69±0,66 ^c	60,93±1,65 ^c
30	0,00±0,00 ^a	10,34±1,73 ^c	37,72±1,65 ^d	54,09±1,77 ^d	67,44±1,65 ^d
40	0,03±0,02 ^b	21,54±1,73 ^d	44,92±1,05 ^e	59,71±1,77 ^e	68,72±2,18 ^d
F	9,14	212,59	881,47	975,22	965,61
Probabilité	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 6 : Données de centrifugation (Suite)

Tableau 14 : Analyse des variances pour la conductivité électrique (mS/cm)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	1828,33±7,51 ^c	1828,33±7,51 ^b	1828,33±7,51 ^b	1828,33±7,51 ^b	1828,33±7,51 ^b
10	1604,00±7,51 ^a	1680,00±5,03 ^a	1684,00±10,69 ^a	1684,00±12,06 ^a	1687,00±15,31 ^a
20	1669,50±43,50 ^b	1689,00±5,03 ^a	1690,00±10,69 ^a	1695,00±12,06 ^a	1697,00±15,31 ^a
30	1678,00±7,51 ^b	1681,00±4,73 ^a	1686,00±10,69 ^a	1685,00±1,15 ^a	1700,00±15,31 ^a
40	1692,00±2,65 ^b	1688,00±4,73 ^a	1700,33±15,37 ^a	1690,00±1,15 ^a	1711,33±11,59 ^a
F	41,77	108,78	58,29	87,74	51,75
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 15 : Analyse des variances pour la teneur en pectine (mg/L)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	426,70±34,54 ^d	426,70±34,54 ^d	426,70±34,54 ^d	426,70±34,54 ^b	426,70±34,54 ^b
10	238,69±6,82 ^c	136,74±7,39 ^c	60,31±2,30 ^c	37,30±2,11 ^c	26,35±2,98 ^a
20	211,00±7,29 ^b	77,69±7,39 ^b	44,42±2,30 ^b	27,23±2,11 ^b	25,75±2,98 ^a
30	225,45±6,82 ^c	50,78±2,11 ^a	37,36±2,30 ^a	28,19±1,26 ^b	22,16±2,98 ^a
40	142,45±13,56 ^a	47,54±2,11 ^a	34,34±2,30 ^a	22,77±1,26 ^a	19,23±2,98 ^a
F	110,57	292,50	363,84	392,39	397,25
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 6 : Données de centrifugation (Suite)

Tableau 16 : Analyse des variances pour le pH

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	3,71±0,00 ^d	3,71±0,00 ^c	3,71±0,00 ^c	3,71±0,00 ^d	3,71±0,00 ^c
10	3,52±0,01 ^a	3,59±0,01 ^a	3,64±0,01 ^{ab}	3,67±0,01 ^c	3,59±0,02 ^a
20	3,56±0,00 ^b	3,70±0,01 ^c	3,63±0,01 ^{ab}	3,66±0,01 ^{bc}	3,63±0,02 ^b
30	3,58±0,01 ^c	3,68±0,01 ^{bc}	3,65±0,01 ^b	3,65±0,00 ^b	3,61±0,02 ^{ab}
40	3,62±0,05 ^c	3,66±0,01 ^b	3,64±0,02 ^a	3,62±0,00 ^a	3,62±0,00 ^b
F	19,69	31,97	9,95	15,95	24,23
Probabilité	0,0001	0,0000	0,0016	0,0002	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 17 : Analyse des variances pour la teneur en protéines (mg/L)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	713,24±23,87 ^d	713,24±23,87 ^c	713,24±23,87 ^c	713,24±23,87 ^c	713,24±23,87 ^b
10	565,31±13,09 ^c	480,52±18,25 ^b	390,41±26,32 ^b	354,57±26,01 ^b	339,44±17,48 ^a
20	543,78±6,22 ^{bc}	390,00±18,25 ^a	352,37±26,32 ^{ab}	332,05±26,01 ^{ab}	339,14±17,48 ^a
30	536,43±13,09 ^b	368,57±13,39 ^a	325,82±26,32 ^a	314,93±11,66 ^a	331,57±17,48 ^a
40	473,80±12,70 ^a	375,07±13,39 ^a	343,70±6,98 ^a	327,67±11,66 ^{ab}	329,68±19,37 ^a
F	54,89	167,35	258,96	219,95	230,76
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 6 : Données de centrifugation (Suite)

Tableau 18 : Analyse des variances pour le rendement en jus de goyave à chair blanche (% m/m)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	-	-	-	-	-
10	89,72±1,25 ^a	95,64±0,45 ^a	97,04±0,69 ^a	97,07±0,69 ^a	96,27±0,12 ^a
20	90,93±1,27 ^a	96,11±0,45 ^{ab}	96,24±0,69 ^a	97,00±0,69 ^a	96,29±0,12 ^a
30	91,16±1,25 ^{ab}	96,62±0,62 ^b	96,03±0,69 ^a	96,49±0,08 ^a	96,78±0,12 ^b
40	93,66±1,51 ^b	96,44±0,62 ^{ab}	96,26±0,35 ^a	97,36±0,08 ^a	97,00±0,41 ^b
F	5180,81	18032,19	17916,12	19667,41	17499,15
Probabilité	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

Tableau 19 : Analyse des variances pour la teneur en matière sèche (% m/m)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	2,85±0,12 ^c	2,85±0,12 ^d	2,85±0,12 ^b	2,85±0,12 ^c	2,85±0,12 ^c
10	2,66±0,06 ^b	2,72±0,08 ^{cd}	2,40±0,13 ^a	2,69±0,03 ^{bc}	2,43±0,03 ^a
20	2,65±0,02 ^b	2,44±0,08 ^{ab}	2,43±0,13 ^a	2,56±0,03 ^{ab}	2,51±0,03 ^{ab}
30	2,51±0,06 ^a	2,63±0,15 ^{bc}	2,56±0,13 ^a	2,41±0,12 ^a	2,50±0,03 ^{ab}
40	2,61±0,01 ^b	2,36±0,15 ^a	2,49±0,02 ^a	2,52±0,12 ^{ab}	2,55±0,09 ^b
F	5,51	8,60	8,24	6,93	6,13
Probabilité	0,0131	0,0028	0,0033	0,0061	0,0093

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité

ANNEXE 6 : Données de centrifugation (Suite)

Tableau 20 : Analyse des variances pour la teneur en sucres solubles totaux (°Brix)

Temps de centrifugation (min)	Vitesse de centrifugation				
	149g (1000 rpm)	597g (2000 rpm)	1343 (3000 rpm)	2388 (4000 rpm)	3731 (5000 rpm)
0	2,3±0,0 ^{ab}	2,3±0,0 ^a	2,3±0,0 ^a	2,3±0,0 ^a	2,3±0,0 ^a
10	2,3±0,1 ^{ab}	2,6±0,1 ^b	2,7±0,1 ^b	2,7±0,1 ^{bc}	2,7±0,0 ^b
20	2,4±0,2 ^a	2,7±0,2 ^b	2,7±0,1 ^b	2,7±0,1 ^{bc}	2,7±0,0 ^b
30	2,4±0,1 ^{ab}	2,6±0,1 ^b	2,7±0,0 ^b	2,6±0,0 ^b	2,7±0,0 ^b
40	2,4±0,1 ^b	2,6±0,1 ^b	2,7±0,0 ^b	2,8±0,0 ^c	2,7±0,1 ^b
F	2,05	20,06	44,44	51,39	35,61
Probabilité	0,1625	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000

Lettre différente pour chaque colonne : significativement différent à 5% de probabilité