Caractérisation préliminaire des polysaccharides pariétaux de la pulpe de corossol et étude de leur dégradation enzymatique

Fabrice Vaillant[a*]
Patricia Millan[b]
Carine Tchiliguirian[a]
Max Reynes[c]

[a] Cirad-flhor, Mission Technologie, A.A. 25770, Cali, Colombie

[b] Département de Sciences et Technologies des Aliments, Université del Valle, Cali, Colombie

[c] Cirad-flhor, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 15 avril 1997
Accepté le 10 février 1998

Fruits, 1998, vol. 53, p. 257–270
© Elsevier, Paris

RESUMEN ESPAÑOL, p. 269

Preliminary characterization of the cell wall polysaccharides of the soursop pulp and study of their enzyme degradation.

Abstract — Introduction. The industrial processing of the soursop is limited: its pulp is extracted by hand and its fragrance is very thermosensitive. The enzyme liquefaction of the pulp could possibly facilitate its mechanical extraction and the subsequent stabilization process by tangential microfiltration. **Materials and methods**. To identify an enzyme preparation adapted to the liquefaction of the soursop pulp, the susceptibility of the cell wall colloids to enzyme degradation has been studied according to the enzyme activities that come into play during different incubations. The composition of carbohydrates, especially galacturonic acids and neutral oses, was first determined on the matter insoluble in alcohol (MIA), and then in the supernatants resulting from the enzyme incubation of the portion of MIA insoluble in water. **Results and discussion**. The MIA of the soursop contains soluble and insoluble cell wall colloids, which represent respectively 1.3% and 2.4% (p/p) of the fresh pulp, and a high level of starch (0.65% p/p). The soluble pectin of the soursop is characterized by a very low galacturonic acid content (24%) and a high degree of esterification (70%). The insoluble pectin is not very linear because of the high recurrence of the rhamnose on the main chain, and the neutral ose, proportionally the most important in lateral chains, is the arabinose. **Conclusion**. The joint activities of the pectin-lyases, the endo- and the exo-cellulases, and the arabinases proved to be essential to obtain a maximal solubility rate of the insoluble cell wall polysaccharides. Among the commercial preparations tested, Rapidase Pomaliq gives a liquefaction rate of the insoluble purified cell walls of 30% after 2 h of incubation for 500 ppm of fresh soursop pulp. (© Elsevier, Paris)

***Annona muricata* / fruits / processing / chemicophysical properties / fruit pulps**

Caractérisation préliminaire des polysaccharides pariétaux de la pulpe de corossol et étude de leur dégradation enzymatique.

Résumé — Introduction. La transformation industrielle du corossol est limitée par l'extraction manuelle de la pulpe et par la thermosensibilité de son arôme. La liquéfaction enzymatique de la pulpe peut apporter une solution en facilitant le dépulpage mécanique et le traitement postérieur de stabilisation par microfiltration tangentielle. **Matériel et méthode**. Pour identifier une préparation enzymatique adaptée à la liquéfaction de la pulpe du corossol, la sensibilité des colloïdes pariétaux à la dégradation enzymatique a été étudiée en fonction des activités enzymatiques mises en jeu lors de différentes incubations. La composition en glucides, principalement acides galacturoniques et oses neutres, a été déterminée préalablement sur la matière insoluble dans l'alcool (MIA) puis dans les surnageants provenant de l'incubation enzymatique de la fraction de MIA insoluble dans l'eau. **Résultats et discussion**. La MIA de corossol contient les colloïdes pariétaux solubles et insolubles qui représentent, respectivement, 1,3 % et 2,4 % (p/p) de la pulpe fraîche, ainsi qu'une forte proportion d'amidon (0,65 % p/p). La pectine soluble du corossol se caractérise par une teneur en acide galacturonique très faible (24 %) et un degré d'estérification élevé (70 %). La pectine insoluble serait peu linéaire, du fait d'une forte récurrence du rhamnose sur la chaîne principale, et l'ose neutre proportionnellement le plus important dans les chaînes latérales est l'arabinose. **Conclusion**. L'application conjointe des activités pectin-lyases, endo- et exocellulases et arabanases se sont révélées essentielles pour obtenir un taux maximal de solubilisation des polysaccharides pariétaux insolubles. Parmi les préparations commerciales testées, Rapidase Pomaliq® permet d'obtenir un taux de liquéfaction des parois purifiées insolubles de 30 % après 2 h d'incubation, pour une dose de 500 ppm par rapport à la pulpe fraîche de corossol. (© Elsevier, Paris)

***Annona muricata* / fruits / traitement / propriété physicochimique / pulpe de fruits**

1. introduction

Le corossol (*Annona muricata* L.) est consommé principalement en jus, mais aussi comme base fruitée pour les produits lactés, dans la plupart des pays d'Amérique latine, ainsi qu'en Inde, à Hawaii et en Asie du sud-est. Le fruit est un gros syncarpe de 0,5 à 1,5 kg résultant de la fusion de fruits individuels regroupés le long d'un cœur fibreux, et constitués d'une enveloppe pulpeuse contenant, chacune, une grosse graine de 1,5 à 2 cm de long. La chaire blanche qui entoure fermement ces graines représente en moyenne 70 % du poids du fruit, elle est légèrement acidulée et très aromatique [1] ce qui en fait un mets exotique exquis présentant un marché international potentiel.

La transformation industrielle du corossol dans les pays producteurs est limitée par le fait que la séparation de la chaire, qui est fortement attachée aux graines, est très délicate à effectuer si l'on veut éviter de briser les graines noires. En l'absence d'équipement spécifique, cette opération est le plus souvent réalisée manuellement. D'autre part, la pulpe de corossol, à cause de son pH relativement faible (pH 3,7), est très sensible aux attaques microbiennes et se décompose rapidement. Son arôme, très volatile, est de plus affecté par les procédés thermiques de pasteurisation et de concentration. Pour préserver ses qualités organoleptiques, la pulpe est donc généralement commercialisée simplement sous forme congelée. L'ensemble de ces contraintes technologiques en fait un produit relativement coûteux à transformer et transporter, ce qui limite sa commercialisation, notamment vers l'Europe.

Dans un tel contexte, les traitements enzymatiques peuvent apporter une solution en :

– fragilisant la structure fibreuse de la pulpe afin de libérer plus aisément les graines,

– abaissant la viscosité pour faciliter la concentration,

– liquéfiant les solides insolubles pour faciliter les traitements de séparation par membrane, utilisable comme technique de stabilisation à faible température.

Des essais préliminaires ont déjà permis d'abaisser, de 62 % environ, la viscosité de la pulpe de corossol en utilisant seulement des pectinases [2]. Néanmoins, pour une liquéfaction plus complète, l'action des pectinases devrait être combinée avec celle de cellulases et d'hémicellulases [3]. Afin de pouvoir sélectionner une préparation commerciale appropriée ou en orienter le développement, la caractérisation des polysaccharides pariétaux de la pulpe de corossol et l'étude de leur sensibilité à la dégradation enzymatique en fonction des différentes activités mises en jeu est apparue nécessaire.

2. matériel et méthodes

2.1. origine et préparation du matériel végétal

Le matériel végétal étudié a été récolté dans une plantation commerciale qui fournit habituellement les industries de transformation de la région. Cette parcelle, dont l'itinéraire technique de production est approuvé par l'Institut colombien d'agronomie (Corpoica), est située à environ 1 000 m d'altitude, dans la vallée du Cauca, en Colombie. La pulpe de corossol, extraite par séparation manuelle de la peau, des graines et du cœur, a été préparée à partir d'un lot homogène de fruits mûrs et sains.

2.2. préparations enzymatiques et réactifs

Les préparations enzymatiques commerciales utilisées provenaient de l'entreprise Gist-Brocades (Seclin, France). Elles sont obtenues à partir de souches d'*Aspergillus niger* pour Rapidase® Pineapple et Cytolase® PCL5, de *Trichoderma longibrachiatum* pour Cytolase® CL, et d'un mélange de ces deux souches pour Rapidase® Pomaliq. Tous les réactifs ainsi que les substrats utilisés étaient de haute pureté. L'eau était distillée puis désionisée.

2.3. mesure des activités enzymatiques des préparations enzymatiques

2.3.1. activité pectine-lyase (PL)

L'activité de la pectine-lyase (EC 4.2.2.10)[1], exprimée en ncat[2], est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 nmole d'acide galacturonique insaturé par seconde à partir d'une solution de pectine commerciale estérifiée à plus de 75 % et solubilisée (0,5 % p/v) dans du tampon citrate-phosphate 0,8 M à pH 6,0, en présence de chlorure de sodium 0,1 M. Ce substrat est incubé avec la préparation enzymatique à 40 °C pendant 15 min. La cinétique d'apparition de l'acide galacturonique insaturé est suivie à 235 nm en considérant le coefficient d'extinction molaire de l'AGU insaturé suivant :

$$\varepsilon_{235\ nm} = 5\ 500\ mol \cdot cm^{-1} \cdot L^{-1}\ [4].$$

2.3.2. activité endo-polygalacturonase (PG)

Une unité (en ncat) de la polygalacturonase (EC 3.2.1.15) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 nmole de groupement réducteur par seconde. Le substrat est constitué par de l'acide polygalacturonique (Sigma p-3889) à 0,5 % (p/v) dissous dans du tampon acétate à 0,1 M, pH 4,0. Le milieu réactionnel est incubé à 40 °C en présence de la préparation enzymatique à tester. Le dosage des groupes réducteurs est réalisé par la méthode de Nelson [5] modifiée par Liu et Luh [6], en utilisant l'acide galacturonique comme étalon.

2.3.3. activité pectinestérase (PE)

L'activité (en ncat) de la pectinestérase (EC 3.1.1.11) est définie comme étant la quantité d'enzyme capable de libérer 1 nmole d'ester par seconde. Le dosage est effectué en titrant les groupements acides apparus par une solution de soude 0,1 M additionnée de façon continue pour maintenir un pH constant égal à 4. Le milieu réactionnel est constitué par de la pectine commerciale hautement estérifiée (degré d'esterification > 90 %) dissout à 1 % (p/v) dans de l'eau pure additionnée de chlorure de sodium à 50 mM [7].

2.3.4. activité endoglucanase (C_x)

L'activité (en ncat) de l'endo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) est définie comme étant la quantité d'enzyme capable de libérer 1 nmole de groupement réducteur par seconde à partir d'une solution de substrat. Celui-ci est constitué par une solution de carboxy-méthyl-cellulose (Sigma C-4888) à 2 % (p/v) dissout dans de l'eau pure, et ajustée avec un tampon acétate 0,1 M à pH 4,6. Le milieu réactionnel est maintenu à 39 °C pendant 10 min, puis les sucres réducteurs apparus sont dosés par la méthode au DNS [8].

2.3.5. activité exoglucanase (C_1)

L'activité (en ncat) exoglucanase correspond à un complexe multienzymatique et est définie comme étant la quantité d'enzyme libérant 1 nmole de groupement réducteur par seconde à partir d'une solution de cellulose cristalline insoluble (Sigma C-6413) à 3 % (p/v) mélangée dans de l'eau pure et ajustée avec un tampon acétate 0,1 M à pH 4,8. L'ensemble est incubé pendant 60 min à 50 °C en présence de la solution enzymatique. La réaction est stoppée en ajoutant 1 mL d'hydroxyde de sodium à 0,075 M. Après centrifugation à 4 000 g, les sucres réducteurs sont dosés sur le surnageant par la méthode colorimétrique à l'acide dinitrosalicylique (DNS) [8].

2.3.6. activité arabinosidase (Exo-Ara)

L'activité (en ncat) de l'α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) est définie comme étant la quantité d'enzyme capable de libérer 1 nmole d'α-L-arabinofuranoside par minute à partir du substrat. Celui-ci est constitué par du p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside (Sigma N-3641) à 0,1 % dissout dans un tampon acétate 0,1 M à pH 4,5. Le milieu est incubé pendant 15 min à 30 °C en présence de la solution enzymatique, puis la réaction est stoppée par l'ajout de 2 mL de tampon glycine 0,5 M à pH 9. Le p-nitrophénol libéré est dosé par spectrophotométrie à 400 nm [9].

---

[1] EC = classification de l'enzyme donnée par un numéro d'ordre attribué selon la nomenclature internationale.

[2] catal = catalytic amount, symbole cat ; 1 U correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute, dans les conditions standard ; 1 U = 16,67 ncat (10^{-9} cat).

2.4. purification des polysaccharides pariétaux

Le matériel pariétal est purifié de façon classique en utilisant la procédure à l'éthanol (*figure 1*). Pour éviter une contamination par les polysaccharides de réserve, un protocole d'élimination de l'amidon par voie enzymatique adapté de Brioullet et al. [10] a été ajouté à la procédure classique.

2.5. fractionnement de la MIA hydrosoluble

Le fractionnement de la matière insoluble dans l'alcool (MIA), hydrosoluble, est effectué par chromatographie d'exclusion stérique.

La MIA soluble dans l'eau est récupérée après centrifugation et concentration des eaux de lavage de la MIA brute (*figure 1*). Le lavage de 50 mg de MIA brute permet d'obtenir 100 mL de solution qui est ensuite concentrée 20 fois au rotavapor, puis lyophilisée. Ce lyophilisat est solubilisé, afin d'obtenir une solution à 1 $mg \cdot mL^{-1}$, dans un tampon acétate 0,1 M, pH 4, contenant du chlorure de sodium 0,2 M. Quatre mL de celle-ci sont injectés dans une colonne Pharmacia C-10 dont le tube a été remplacé par un tube de 90 cm de hauteur pour un diamètre intérieur de 1,1 cm. La colonne est garnie d'un gel Sephadex G-100 (Sigma G-100-120), permettant le fractionnement des protéines en molécules de 4 000 à 150 000 d (V_x)[3]. Le débit d'élution du tampon acétate 0,1 M, pH 4, contenant le chlorure de sodium 0,2 M est de 20 $mL \cdot h^{-1}$; il est assuré par une pompe péristaltique.

La détermination de la concentration en acide galacturonique et en oses neutres est effectuée sur des échantillons de 4 mL de solution. Pour chaque fraction recueillie, le coefficient de partage, ou Kav, qui permet de s'affranchir des dimensions de la colonne, est calculé par la formule Kav = (Ve-Vo)·(Vt-Vo), où Ve = volume d'élution de la fraction considérée, Vo = volume d'exclusion ou volume mort de la colonne, Vt = volume total de la colonne.

2.6. dosages et analyses effectuées sur les parois isolées

2.6.1. dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué sur la MIA brute par macrodosage de l'azote total selon la méthode de Kjeldahl.

2.6.2. dosage des tanins

La teneur en tanins résiduels condensés dans la MIA brute a été estimée par la méthode proposée par Price et al. [11], utilisant le réactif vanilline-HCl. Le résultat a été exprimé en pourcentage de catéchine équivalent.

2.6.3. dosage de l'amidon

L'amidon a été solubilisé par voie enzymatique avec du Thermamyl 120 L®, à partir d'une suspension de MIA brute. Le surnageant a ensuite été hydrolysé en glucose, également par voie enzymatique, en utilisant une amyloglucosidase, puis il a été dosé par spectrophotométrie par la méthode utilisant la glucose oxydase [12].

2.6.4. dosage de la lignine

La lignine a été dosée sur la MIA insoluble dans l'eau par la méthode gravimétrique, après 1 h d'hydrolyse à chaud (120 °C) dans l'acide sulfurique 7 M, suivie d'un rinçage et d'un séchage sous vide [13].

2.6.5. mesure du taux d'acide galacturonique

La concentration en acide galacturonique (AGU) a été mesurée après une hydrolyse par l'acide sulfurique concentrée, effectuée directement sur les fractions et surnageants ou sur une solution de MIA hydrosoluble lyophilisée. Le dosage a été réalisé par réfractométrie à 520 nm, selon la méthode utilisant le réactif métahydroxydiphényle (MHDP) [14]. Une gamme étalon avait été effectuée avec l'AGU en reportant la concentration en anhydro-moles. Le degré de pureté en AGU de la pectine a été déterminé en fonction de la concentration en MIA hydrosoluble initiale.

[3] $d(V_x)$ = abréviation de dalton, unité de base atomique qui correspond au seizième de la masse d'un atome moyen d'oxygène.

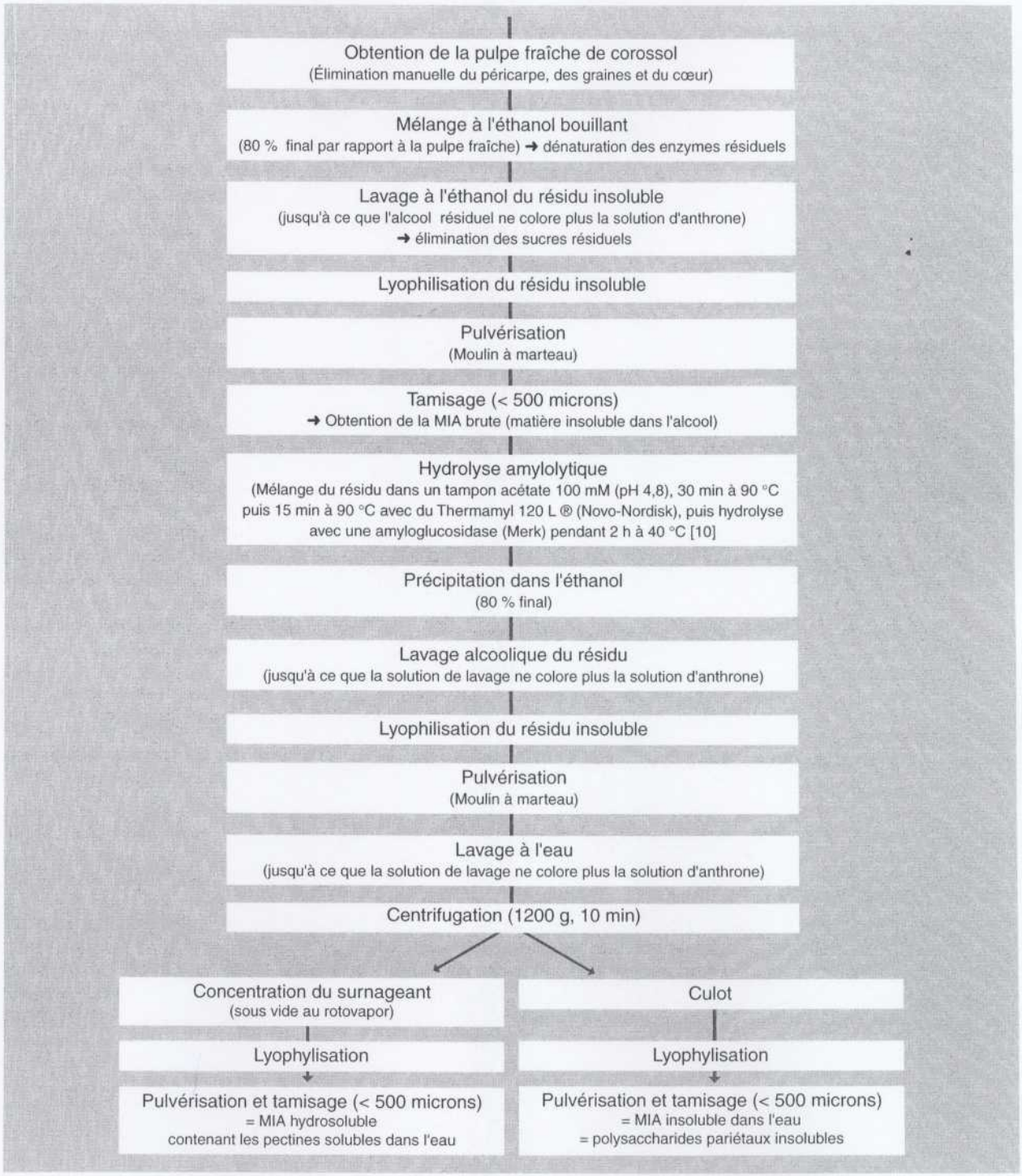

Figure 1.
Schéma opérationnel présentant la suite des traitements appliqués à la pulpe fraîche de corossol pour obtenir les parois purifiées.

2.6.6. détermination du degré d'estérification

Le dosage des esters méthyliques a été effectué, après hydrolyse alcaline d'une solution de MIA hydrosoluble, suivant la méthode enzymatique utilisant l'alcool oxydase [15]. Le degré d'estérification a été exprimé en pourcentage d'AGU estérifié par rapport à la concentration en AGU de la solution.

2.6.7. dosage des oses neutres

Le dosage des oses neutres a été réalisé après hydrolyse, par l'acide sulfurique concentré, des polysaccharides pariétaux séparés dans les fractions ou solubilisés dans le surnageant obtenu après enzymation de la MIA lavée. Les oses neutres libérés ont été dosés par le réactif à l'anthrone [16]. Des gammes étalons d'acide galacturonique et glucose ont été utilisées. Les valeurs retenues correspondent à la moyenne de deux essais, diminuée du résultat obtenu dans l'essai témoin et de l'interférence de l'AGU.

2.6.8. hydrolyse enzymatique des parois isolés

La MIA lavée contient les polysaccharides pariétaux insolubles en solution aqueuse. Cinquante mg de cette matière sont mis en suspension dans 10 mL de tampon acétate 0,1 M, ajusté à un pH de 3,7, car correspondant au pH moyen mesuré sur la pulpe de corossol. La solution obtenue est placée dans un bain thermostaté à 40 °C et mis sous agitation magnétique à 60 rpm ('revolutions per minute'). La préparation enzymatique est ajoutée lorsque la température a atteint l'équilibre et l'agitation est maintenue pendant tout le temps de l'incubation. La proportion de solution enzymatique ajoutée correspond à 500 ppm par rapport à la pulpe fraîche, soit 0,9 mL pour 50 mg de MIA lavée. L'enzyme est inactivée en plaçant le milieu réactionnel dans un bain à 80 °C pendant 2 min, avant de le refroidir dans un bain de glace fondante, puis de le centrifuger à 1 300 g pendant 5 min. Les différents dosages sont effectués sur le surnageant. Tous les essais subissent trois répétitions et la moyenne des résultats est reportée, corrigée, en retranchant les valeurs obtenues pour les témoins incubés dans les mêmes conditions mais sans préparation enzymatique.

2.6.9. détermination de l'indice théorique de solubilisation

Les composés solubilisés sont constitués principalement par les oses neutres et les acides uroniques. L'indice théorique de solubilisation correspond à la somme de leurs concentrations, exprimées en $mg \cdot mL^{-1}$, résultant de l'action des enzymes, ramenée à la concentration en MIA utilisée initialement [17] :

$$\textit{Indice théorique de solubilisation (en \%)} = \frac{\textit{Concentration en AGU} + \textit{concentration en oses neutres}}{\textit{Concentration en MIA}} \times 100$$

Cette valeur est facilement mesurable lors des différents essais, alors que la pesée a posteriori du culot, après enzymation et centrifugation de la MIA, s'est révélée insatisfaisante pour évaluer le pourcentage de solubilisation.

2.6.10. analyse des oses neutres libérés dans les surnageants

L'analyse des oses neutres libérés dans les surnageants a été réalisée par HPLC.

Les surnageants ont été hydrolysés dans l'acide sulfurique concentré 2 N afin de libérer, à partir des polysaccharides pariétaux solubilisés par les enzymes, des monomères de sucres neutres. Après 2 h d'ébullition, le milieu a été neutralisé à pH 4 par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium 10 M. La solution a ensuite été filtrée sur filtre de porosité 0,45 µm avant d'être analysée par HPLC. L'appareillage utilisé est un chromatographe doté d'une colonne Biorad-Aminex HPX 87H, thermostatée à 40 °C. L'éluant est une solution d'acide sulfurique 6 mM et le débit d'élution est de 0,5 $mL \cdot min^{-1}$ [18]. Le détecteur est un réfractomètre Merck RI-71 dont le signal est analysé par un intégrateur Hitachi D-2500.

Les résultats obtenus sur des solutions étalons d'oses neutres (*tableau I*) montrent que cette méthode ne permet de doser que le glucose, le rhamnose et l'arabinose. Les autres sucres – tels que le galactose, le xylose et le manose – ont des temps de rétention trop proches. La concentration de ces trois derniers sucres a été déterminée globalement et exprimée en équivalents galactose.

Tableau I.
Temps de rétention, mesurés par HPLC, à partir de solutions étalons d'oses neutres.

Sucre étudié	Temps de rétention (min)
Arabinose	13,2
Galactose	11,9
Glucose	11,1
Mannose	11,9
Rhamnose	12,6
Xylose	11,9

3. résultats et discussion

La pulpe fraîche du corossol contient 4,3 % (p/p) [23,4 % × 18,5 % (*figure 2*)] de résidus insolubles dans l'alcool ou MIA brute contenant à la fois les colloïdes pariétaux et les polysaccharides de réserve. L'analyse de cette MIA brute a révélé qu'elle contenait des teneurs importantes en amidon – 15 % de la MIA brute (*tableau II*), soit 0,65 % de la pulpe fraîche –, ce qui a justifié la mise en place d'une étape d'hydrolyse amylolytique afin de mieux purifier les polysaccharides pariétaux. D'autre part, les faibles teneurs en protéine et tanins mesurées sur la MIA – respectivement 1 % et 0,9 % (*tableau II*) – indiquent que, contrairement à d'autres fruits comme la goyave [19] ou la mangue [20], l'isolement des parois cellulaire de corossol en milieu alcoolique peut être effectué d'une part avec un faible tannage des protéines et d'autre part sans contamination importante par les protéines cytoplasmiques. Ainsi, la méthode choisie pour l'isolement des parois cellulaires du corossol affecterait relativement peu la composition des colloïdes du corossol et, tout en facilitant considérablement les

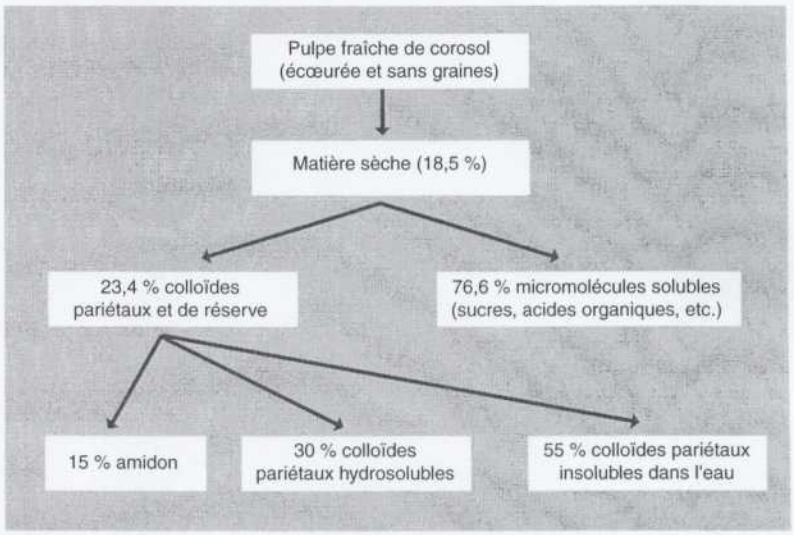

Figure 2.
Composition en colloïdes pariétaux de la pulpe de corossol.

Tableau II.
Éléments entrant dans la composition des parois cellulaires de la pulpe de corossol.

Fraction extraite de la pulpe	Amidon (% p/p)	Protéine (% p/p)	Tanin (équivalent catéchine % p/p)	(AGU) (% p/p)	Méthanol (% d'AGU)	Lignine
MIA brute	15 %	1 %	0,9 %	–	–	–
MIA hydrosoluble	–	–	–	24 %	70 %	–
MIA insoluble	–	–	–	–	–	8,3 %

AGU : acide galacturonique.
MIA : matière insoluble dans l'alcool.

analyses, elle devrait nous permettre de mieux comprendre l'effet des réactions enzymatiques sur leur substrat.

3.1. substances pectiques solubles

La MIA hydrosoluble représente 1,3 % (p/p) [30 % × 23,4 % × 18,5 % (*figure 2*)] de la pulpe fraîche de corossol après hydrolyse amylolytique de la MIA brute et cette fraction peut être assimilée pratiquement à la pectine soluble. La teneur en acide galacturonique de cette pectine est seulement de 24 % (*tableau II*). C'est une valeur très faible si on la compare à la pectine d'agrumes pour laquelle la teneur en AGU est supérieure à 80 % [21]. Le degré d'estérification (DE) de cette pectine est d'environ 70 % (*tableau II*). La pectine de corossol est donc relativement pauvre en acides galacturoniques et son degré d'estérification est élevé. Les résultats de la chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G100 prouve également que la pectine de corossol est très substituée par des chaînes latérales d'oses neutres, même si ce résultat global cache des disparités (*figure 3*). Nous observons 2 pics distincts d'AGU et d'oses neutres. Le premier pic, sortant à des coefficients de partage (Kav) compris entre –0,1 et 0,05, correspond aux pectines de haut poids moléculaire. Cette fraction est constituée globalement de 45 % d'AGU et 55 % d'oses neutres. La seconde fraction sort à des Kav compris entre 0,8 et 1,1 : elle représente les chaînes plus courtes de pectine. Contrairement aux observations faites à propos du premier pic, la proportion d'oses neutres, de 70 %, est beaucoup plus importante dans ce deuxième pic. Il peut s'agir de contaminants constitués par de courtes chaînes résiduelles d'hémicellulose hydrosoluble, ou encore d'une partie des zones chevelues de pectines, libérées au cours de la maturation par les enzymes endogènes du fruit. D'après ces résultats, la pectine soluble de corossol serait constituée par des chaînes homogalacturoniques relativement courtes, très fréquemment entrecoupées par des chaînes longues latérales d'oses neutres. Cette constitution implique que, pour l'hydrolyse complète de cette pectine soluble, des pectinases, et, plus spécifiquement, la pectine-lyase active sur les fractions homogalacturonique hautement méthylée agissent simultanément avec des hémicellulases.

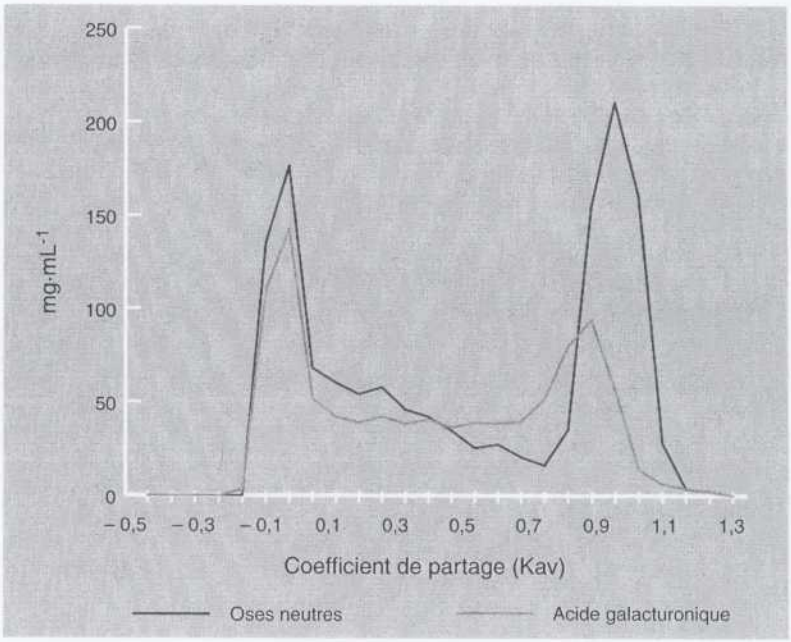

Figure 3.
Profil d'élution d'une solution de pectine soluble de corossol, effectuée à l'aide d'une colonne de 90 cm × 1,1 cm contenant un gel Sephadex G-100, débit 20 mL·h^{-1}.
Pour chaque fraction recueillie, le coefficient de partage, ou Kav, est calculé par la formule Kav = (Ve-Vo)·(Vt-Vo), où Ve = volume d'élution de la fraction considérée, Vo = volume d'exclusion ou volume mort de la colonne, Vt = volume total de la colonne.

3.2. dégradation enzymatique des polysaccharides pariétaux insolubles

Les préparations enzymatiques commerciales utilisées ont été analysées afin de déterminer les valeurs des principales activités enzymatiques présentes (*tableau III*). Pour les lots utilisés, Rapidase® Pineapple s'est révélée pauvre en cellulases – les activités endo et exoglucanase (C_x et C_1) sont respectivement de 1,25 et 0,02 ncat –, alors que Cytolase® CL, avec une activité C_x = 15,3 et C_1 = 3,2 ncat, apparaît riche en cellulases, mais pauvre en pectinases – aucune activité pectinestérase (PE) n'est détectée et celle de la pectine-lyase (PL) est seulement de 0,05 ncat –, et que Rapidase® Pomaliq est relativement équilibrée en pectinases – les activités de PE et PL sont de 2,6 et 0,9 ncat, respectivement – et cellulases – les activités C_x et C_1 sont

Tableau III.
Principales activités glycohydrolases des préparations commerciales utilisées pour étudier la dégradation enzymatique des polysaccharides pariétaux insolubles de la pulpe de corossol.

Préparation enzymatique commerciale	Activités enzymatiques étudiées					
	Pectine-lyase (PL)	Endo-polygalacturonase (PG)	Pectinestérase (PE)	Endoglucanase (C_X)	Exoglucanase (C_1)	Arabinosidase (Exo-ara)
Pomaliq	0,9	14	2,6	5	0,07	0,1
Pineapple	0,36	11,7	2,4	1,25	0,02	0,05
Cytolase	0,05	0,14	0	15,3	3,2	0,03

de 5 et de 0,07 ncat respectivement. Les préparations enzymatiques appliquées ont été choisies le plus judicieusement possible afin de pouvoir observer des différences significatives lors de l'analyse des surnageants provenant de l'incubation de la MIA insoluble du corossol (*figure 4.a et .b*).

Les colloïdes pariétaux insolubles représentent 2,4 % p/p de la pulpe fraîche de corossol (*figure 2*), ce qui, comparé aux taux obtenus sur la mangue (1 % ; [20]), la goyave (0,9 % ; [19]) ou la pomme (1,5 % ; [22]), est une valeur relativement importante. Ces parois purifiées contiennent 8,3 % de lignine (*tableau II*). L'ensemble de ces valeurs témoigne de la structure extrêmement fibreuse de la pulpe de corossol.

Pour les essais d'incubation, la dose d'enzyme choisie correspond à l'équivalent de 500 ppm par rapport à la pulpe fraîche. Après 2 h d'incubation, les concentrations les plus importantes d'acide galacturonique (AGU) libéré dans le surnageant ont été obtenues logiquement avec les préparations les plus riches en pectinases, soit respectivement Rapidase® Pomaliq (12 % d'AGU libéré par rapport au poids initial de MIA) et Rapidase® Pineapple (8 %). Pendant le même laps de temps, Cytolase® CL a libéré moins de 4 % en poids d'AGU. Les incubations libérant le plus d'oses neutres ont été celles effectuées avec Rapidase® Pomaliq et Cytolase® CL correspondant, respectivement, à une solubilisation de la MIA de 24 % et 17 %. Ce sont les préparations contenant les plus fortes activités endo et exocellulases (C_X et C_1). Ces deux activi-

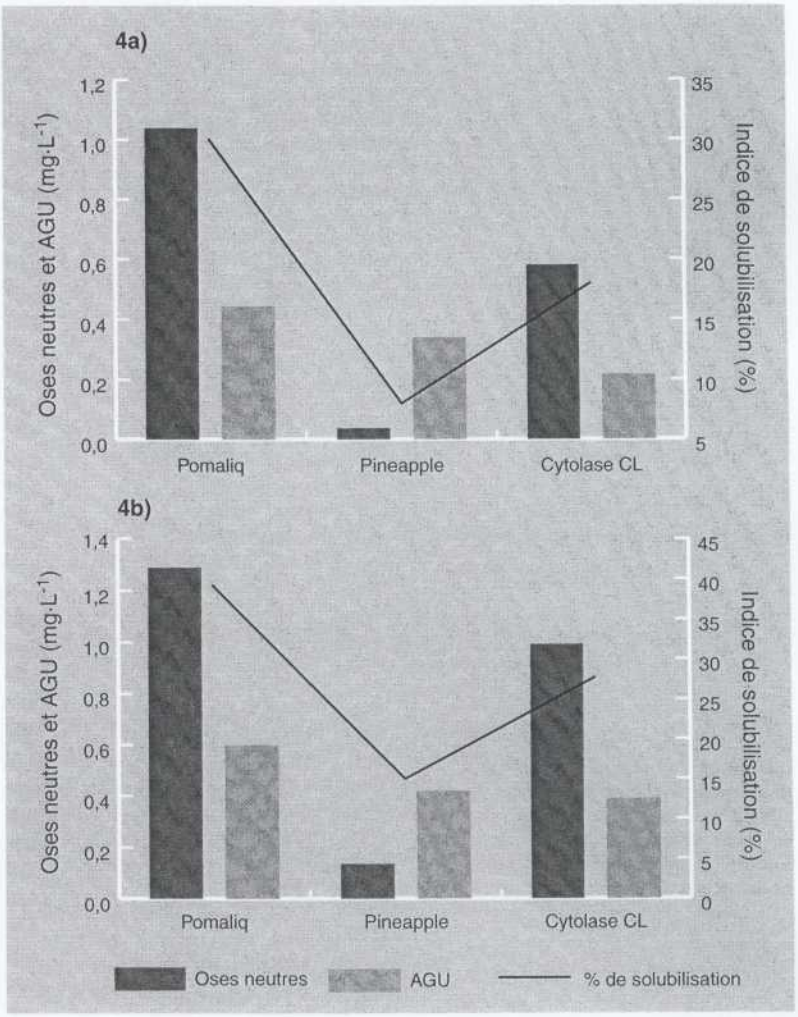

Figure 4.
Analyse des teneurs en oses neutres et en acide galacturonique (AGU), du surnageant des solutions obtenues après enzymation de la matière insoluble dans l'alcool, extraite de pulpe fraîche de corossol. a) après 2 h d'incubation ; b) après 6 h d'incubation.

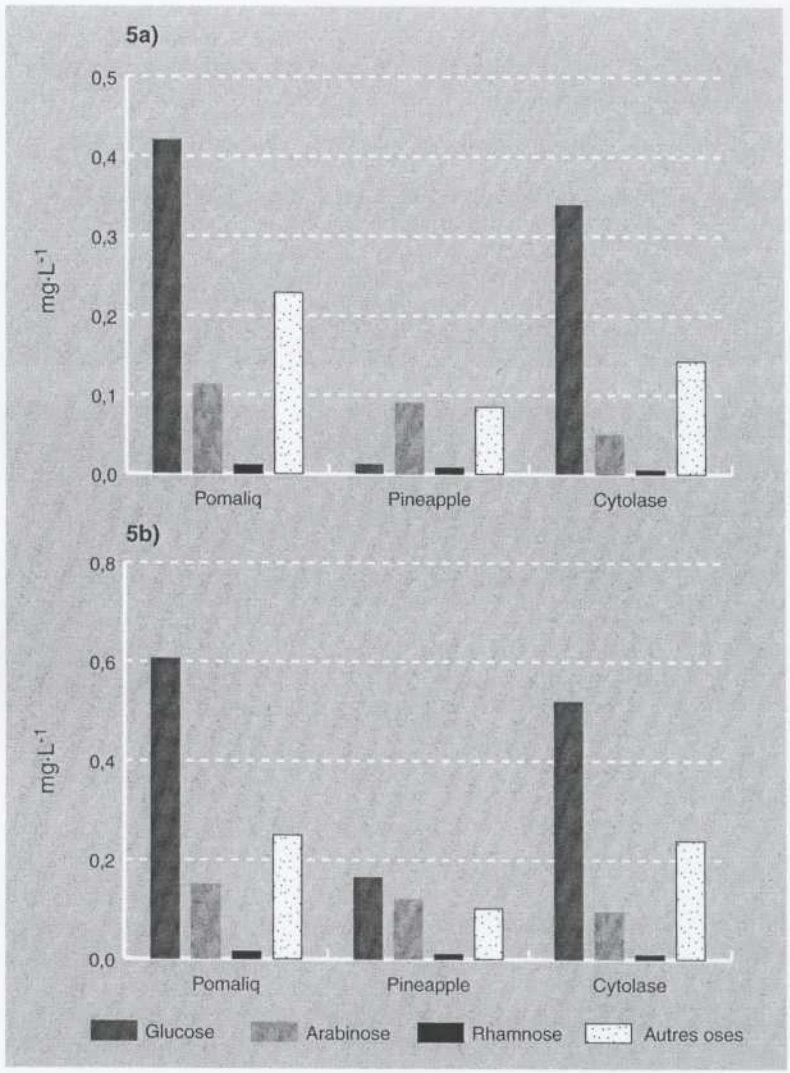

Figure 5.
Dosage des oses neutres du surnageant des solutions obtenues après enzymation de la matière insoluble dans l'alcool, extraite de pulpe fraîche de corossol.
a) après 2 h d'incubation ;
b) après 6 h d'incubation.

tés complémentaires permettent l'attaque des micelles cellulosiques natives (C_x) et de la libération du glucose à partir des extrémités non réductrices (C_1) [23]. Cytolase® CL, pourtant beaucoup plus riche en cellulases que Rapidase® Pomaliq, est cependant moins active sur la cellulose de la MIA quel que soit le temps d'action. Ces meilleures performances de Rapidase® Pomaliq ne peuvent pas s'expliquer par la seule présence d'une forte activité arabinase (100 ncat·mL^{-1}), car cette enzyme attaque principalement les chaînes latérales des pectines déjà solubilisées dans le surnageant. En fait, un effet synergique peut être observé à nouveau entre l'action des pectinases et des cellulases [24, 25]. Rapidase® Pomaliq, qui contient moins de cellulase que Cytolase® CL, est plus rapide et plus active pour solubiliser la cellulose. Cet effet synergique est moins marqué au bout de 6 h d'incubation. L'indice théorique de solubilisation obtenu avec Rapidase® Pineapple stagne dès 2 h d'incubation, démontrant ainsi que toute la pectine accessible aux pectinases est solubilisée. Les pectinases seules ne peuvent pas libérer la pectine insoluble enfouie dans la matrice cellulosique.

Après 2 h et 6 h d'incubation, le gain de solubilisation observé avec Rapidase® Pomaliq a été, respectivement, 3,7 et 2 fois plus important que celui obtenu avec Rapidase® Pineapple, et 1,7 et 1,1 fois plus important que celui mesuré avec Cytolase® CL. L'effet synergique a représenté un gain de solubilisation d'environ 15 % à l'issue de 2 h d'incubation par rapport à la somme des effets obtenus avec les deux préparations déséquilibrées en pectinases ou en cellulases. Au terme de 6 h, l'effet synergique a tendu à être comblé par les activités résiduelles pectinases ou cellulases qui continuaient d'agir.

3.3. caractérisation des oses neutres dans les surnageants

L'analyse plus précise, effectuée par HPLC, des glucides neutres libérés dans le surnageant des solutions obtenues après enzymation de la matière insoluble dans l'alcool (MIA), extraite par traitement de pulpe fraîche de corossol, a montré que, excepté pour l'enzymation effectué à l'aide d'une solution de Rapidase® Pineapple pendant une incubation de 2 h, le glucose représentait, dans tous les autres cas, plus de 50 % des oses neutres libérés dans le surnageant (*figure 5.a et .b*). En l'absence d'amidon, ce sucre provient essentiellement de l'hydrolyse des micelles cellulosiques par les cellulases et de l'hydrolyse des chaînes latérales de pectine ou d'hemicellulose. Deux heures d'incubation avec Rapidase® Pineapple n'ont pas permis de solubiliser des polysaccha-

rides riches en glucose dans le milieu. Cette préparation qui contient principalement des activités pectinases reste pratiquement inactive sur la matrice cellulosique. Dans ce cas les autres oses neutres libérés sont directement associés aux substances pectiques. L'arabinose se révèle ainsi comme le sucre dominant dans les zones chevelues de la pectine. Sa concentration quelques soient les essais est à peu près proportionnelle (entre 23 et 29 %) à celle de l'acide galacturonique (*tableau IV*), ce qui prouve que l'arabinose est, dans ce cas, bien lié aux substances pectiques. De même que pour l'arabinose, le rapport des concentrations en rhamnose s'est révélé proportionnel à la concentration en AGU, quelle que soit la préparation enzymatique mise en œuvre (*tableau IV*). Le rhamnose est en effet, lui aussi, associé intimement aux substances pectiques et c'est le principal point de branchement des chaînes latérales au sein de la chaîne rhamnogalacturonique [17]. Pour tous les essais, le poids du rhamnose représente entre 2,3 et 2,5 % du poids de l'AGU. Cela correspond à un résidu rhamnose pour 34 à 37 unités d'AGU. À titre de comparaison, la pectine de pomme contient un résidu rhamnose pour 116 unités d'AGU [17]. Ce résultat prouve bien que la pectine insoluble est, comme la pectine soluble, très ramifiée et peu linéaire.

La caractérisation des oses neutres constitutifs des polysaccharides libérés dans le surnageant après enzymation prouve aussi que l'effet synergique entre pectinases et cellulases est dû à l'association plus ou moins intime des substances pectiques et cellulosiques. Grâce à l'action conjuguée des pectinases et des cellulases, Rapidase® Pomaliq libère environ 20 % en plus de pectine (AGU) et de cellulose (glucose) par rapport à, respectivement, Rapidase® pineapple et Cytolase CL. Cette portion additionnelle correspond aux polysaccharides agrégés qui ne peuvent être solubilisés rapidement par l'action isolée des cellulases ou des pectinases.

Compte tenu de toutes ces remarques sur la structure et la composition des polysaccharides pariétaux du corossol, pour une liquéfaction enzymatique optimale et rapide, il est nécessaire de mettre en œuvre, conjointement, au moins, les activités amylase, pectin-lyase, endo-cellulase, exoglucanase et arabinase. Cette dernière activité, souvent considérée comme secondaire, apparaît comme essentielle dans ce cas pour hydrolyser les chaînes latérales d'oses neutres libérées par les pectinases. Ces portions de chaînes rhamnogalacturoniques associées aux arabinanes peuvent atteindre un poids moléculaire important [26] et peuvent accélérer le processus de colmatage des membranes lors de la filtration ou former un trouble lors du stockage comme c'est le cas pour la pomme [27].

4. conclusion

La pulpe de corossol est riche en résidus insolubles dans l'alcool (4,3 % p/p de MIA), dont 85 % correspondent aux poly-

Tableau IV.
Rapports entre les concentrations (en mg·mL^{-1}) en arabinose (C_{ara}) ou en rhamnose (C_{rha}) et celle en acide galacturonique (C_{AGU}).

Préparation commerciale	C_{AGU} (mg·mL^{-1})		C_{ara} / C_{AGU} (%)		C_{rha} / C_{AGU}	
	2 h	6 h	2 h	6 h	2 h	6 h
Pomaliq	0,44	0,60	25,4	25,0	2,47	2,50
Pineapple	0,34	0,42	26,5	28,6	2,35	2,38
Cytolase	0,22	0,39	23,1	24,4	2,30	2,30

saccharides pariétaux. Les 15 % de MIA restant, qui correspondent à 0,65 % de la pulpe, correspondent à l'amidon qui est contenu dans la pulpe du fruit même après sa maturité optimale. La fraction hydrosoluble de la pectine se caractérise par une faible proportion en acide galacturonique (24 %) et un taux d'estérification relativement élevé (70 %). L'analyse des oses neutres constitutifs des polysaccharides insolubles libérés dans les surnageants après incubation enzymatique a révélé que l'arabinose était dominant dans les chaînes latérales d'oses neutres associées aux substances pectiques. Cette analyse a également mis en évidence un effet de synergie entre les pectinases et les cellulases, qui permet d'accroître d'environ 20 % l'indice de solubilisation des pectines et des celluloses plus ou moins fortement associées. La combinaison des méthodes d'analyses biochimiques et enzymatiques a permis de déduire certaines caractéristiques de la structure des colloïdes et de définir les activités à mettre en jeu pour solubiliser au mieux les polysaccharides pariétaux. Compte tenu de cette caractérisation préliminaire, une préparation enzymatique appropriée pour la liquéfaction de la pulpe de corossol devra contenir au moins les activités amylase, pectin-lyase, cellulase (endo et exoglucanase) et arabinase. L'action combinée de ces quatres dernières activités, contenues dans la préparation commerciale Rapidase® Pomaliq, a permis de solubiliser, à l'issue de 2 h et 6 h d'incubation et pour une dose équivalente à 500 ppm de préparation par rapport à la pulpe fraîche, respectivement, 30 et 40 % des parois purifiées insolubles de corossol.

remerciements

Les auteurs expriment leur reconnaissance pour leur aimable collaboration à Mme. C. Grassin et M. S. Toumelin de la société Gist-Brocades (Seclin), ainsi qu'à Mmes T. Sanchez et N. Narvaez du Centre international de recherche en agronomie tropicale (Cali, Colombie).

références

[1] Macleod A.J., Pieris N. M., Volatile flavor components of soursop (*Annona muricata*), J. Agr. Food Chem. 29 (3) (1981) 488–490.

[2] Yusolf S., Ibrahim N., Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment, Food Chem. 51 (1994) 83–88.

[3] Voragen A.G.J., Heutink R., Pilnik W., Solubilization of apple cell wall with polysaccharide degrading enzymes, J. App. Biochem. 2 (1980) 452–458.

[4] De Vries J.A., Rombouts F.M., Voragen A.G.J., Pilnik W., Enzymatic degradation of apple pectins carbohydrate polymers, Carbohyd. polym. 2 (1982) 25–33.

[5] Nelson N., A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem. 153 (1944). 378–380.

[6] Liu Y.K., Luh B.S., Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Rhizopus arrhizus*, J. Food Sci. 43 (1978) 721–726.

[7] Maldonado M.C., Navarro A., Callieri D., Production of pectinesterases by *Aspergillus* sp. using differently pretreated lemon peel as the carbon source, Biotechnol. lett. 8 (7) (1986) 501–504.

[8] Miller G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, Anal. Chem. 31 (1959) 426–428.

[9] Rombouts F.M., Voragen A.G.J., Searlewan-leuven M.J.F., Geraeds C.C.J.M., Schols H.A., Pilnik W., The arabinases of *Aspergillus niger*. Purification and characterization of two α-L-arabinofuranosidases and an endo-1,5-α-L-arabinase, Carbohyd. Polym. 9 (1988) 25–47.

[10] Brillouet J.M., Rouau X., Hoebler C., Barry J.L., Carré B, Lorta E., A new method for determination of insoluble cell walls and soluble nonstarchy polysaccharides from plants materials, J. Agr. Food Chem. 36 (5) (1988) 969–979.

[11] Price L.M., Van-Scoyoc S., Butler G.L., A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, J. Agr. Food Chem. 26 (1978) 1214–1218.

[12] Batey I.L., Starch analysis using thermostable α-amylase, Starch 34 (1982) 125–128.

[13] Effland M.J., Modified procedure to determine acid-insoluble lignine in wood and pulp, Tappi J. 60 (1977) 143–144.

[14] Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., New method for quanitative determination of uronic acids, Anal. Biochem. 54 (1973) 484–489.

[15] Klavons J.A., Bennet R.D., Determination of methanol using alcohol oxyade and its application to methyl ester content of pectins, J. Agr. Food Chem. 34 (1986) 597–599.

[16] Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Robers P.A., Smith F., Colorimetric method for sugars and related substances, Anal. Chem. 28 (1956) 350–356.

[17] Thibault J.F., Étude structurale de substances pectiques à l'aide d'une endopolygalacturonase d'*Asperillus niger* : purification, propriétés et possibilités d'utilisation de cette enzyme, Université de Nantes, Nantes, France, 1983.

[18] Ross Fisher L., Dorselyn C.C., Simultaneous determination of carbohydrates and products of carbohydrate metabolism in fermentation mixtures by HPLC, J. Chromatograph. Sci. 25 (1987) 112– 117.

[19] Marcelin O., Saulnier L., Brioullet J.M., Extraction and characterisation of water-soluble pectic substances from guava (*Psidium guajava* L.) pulp, Carbohyd. Res. 212 (1991) 159–167.

[20] Olle D., Lozano Y.F., Brioullet J.M., Isolation and characterization of soluble polysaccharides and insoluble cell wall material of the pulp from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars, J. Agr. Food Chem. 44 (1996) 2658–2662.

[21] Voragen A.G.J., Schols H. A., Pilnik W., Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by HPLC, Food Hydrocolloid. 65 (1) (1986) 65–70.

[22] Stevens B.J.H., Selvedran R.R., Structural features of cell-wall polymers of the apple, Carbohyd. Res. 135 (1884) 155–166.

[23] Rombouts F. M., Pilnik W., Enzymes in fruit and vegetable juice technology, Process Biochem. 13 (8) (1978) 9–13.

[24] Ben-Shalom N., Hindrance of hemicellulose and cellulose hydrolysis by pectic substances, J. Food Sci. 51 (3) (1986) 720–730.

[25] Pilnik W., Voragen A.G.J., Effect of enzyme treatment on the quality of processed fruit and vegetables, Fruit Process. 1 (8) (1991) 125–129.

[26] Sreenath H.K., Sudarshanakrishna K.R., Krishnaswamy S., Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases, J. Ferment. Bioeng. 78 (6) (1994) 486–488.

[27] Voragen A.G.J., Geerst F., Pilnik W., Hemicellulase in enzymic fruit processing. Uses of enzymes in food technology, in: P. Dupuy, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, France,1982, pp. 497–502.

Caracterización preliminar de los polisacáridos parietales de la pulpa de guanábana y estudio de su degradación enzimática.

Resumen — Introducción. La transformación industrial de la guanábana está limitada por la extracción manual de la pulpa y por la termosensibilidad de su aroma. La licuefacción enzimática de la pulpa puede constituir una solución ya que facilita el despulpado mecánico y el posterior tratamiento de la estabilización mediante microfiltración tangencial. **Material y método**. Para identificar una preparación enzimática adaptada a la licuefacción de la pulpa de guanábana se estudió, en función de las actividades enzimáticas realizadas en diferentes incubaciones, la sensibilidad de los coloides parietales a la degradación enzimática. Previamente se determinó, en la materia insoluble en alcohol (MIA) y en los sobrenadantes, procedentes de la incubación enzimática de la fracción de MIA insoluble en agua, la composición en glúcidos, sobre todo ácidos galacturónicos y almidones hidrolizados neutros. **Resultados y discusiones**. La MIA de guanábana contiene los coloides parietales solubles e insolubles que constituyen, respectivamente, el 1,3 % y el 2,4% de la pulpa fresca, así como una alta concentración de almidón (0,65% p/p). La pectina soluble de la

guanábana se caracteriza por su bajo contenido en ácido galacturónico (24%) y su alto grado de esterificación (70%). La pectina insoluble es poco lineal debido a la repetición de la ramnosa en la cadena principal; el almidón hidrolizado neutro proporcionalmente más importante en las cadenas laterales es la arabinosa. **Conclusión**. La aplicación conjunta de las actividades pectin liasas, endocelulasas, exocelobiohidrolasas y arabanasas se han revelado esenciales para obtener el mayor grado de solubilización depolisacáridos parietales insolubles. Dentro de los preparados comerciales probados, Rapidasa Pomaliq® permite la obtención de un porcentaje de licuefacción de membranas purificadas insolubles de 30% tras 2 h de incubación, para 500 ppm de pulpa fresca de guanábana. (© Elsevier, Paris)

***Annona muricata* / frutas / procesamiento / propiedades fisicoquímicas / pulpas de frutas**