



HAL
open science

Nature des polysaccharides issus du process d'extraction du saccharose à partir de la betterave

Abderrahim Belghiti Alaoui

► **To cite this version:**

Abderrahim Belghiti Alaoui. Nature des polysaccharides issus du process d'extraction du saccharose à partir de la betterave. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1993. Français. NNT : 1993INPL124N . tel-01776480

HAL Id: tel-01776480

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776480>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

(M) 1993 BELGHITI ALAOU, A.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE ET DES INDUSTRIES
ALIMENTAIRES

THESE

Présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INPL

Spécialité
Biotechnologie et Industries Alimentaires

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

par

Abderrahim BELGHITI ALAOU

Sujet

NATURE DES POLYSACCHARIDES ISSUS DU
PROCESS D'EXTRACTION DU SACCHAROSE A
PARTIR DE LA BETTERAVE

Soutenue publiquement
le 29 Octobre 1993

devant la commission d'examen

Membres du Jury:

MM.	R. BONALY	Professeur
	M. MATHLOUTHI	Professeur
	M. METCHE	Professeur
	G. ROUSSEAU	Directeur de développement
	B. ROVEL	Maître de Conférences

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (Institut National Polytechnique de Lorraine, France) sous la direction de Monsieur le Professeur M. METCHE.

Tout d'abord, je remercie la Générale Sucrière pour le soutien matériel et financier qu'elle nous a apporté pour la réalisation de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur M. METCHE pour sa disponibilité et son aide tout au long de cette étude, ainsi que pour les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Je remercie Monsieur R. BONALY Professeur de biochimie à la Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Nancy pour avoir bien voulu examiner ce travail en tant que rapporteur.

J'exprime tout particulièrement toute ma gratitude à Monsieur M. MATHLOUTHI Professeur de chimie industrielle à la Faculté des Sciences de Reims qui a eu l'amabilité de venir jusqu'à Nancy pour faire partie de mon jury en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier Monsieur G. ROUSSEAU Directeur de développement de la Générale Sucrière qui a voulu apporté son jugement sur mon travail et a accepté d'être membre de mon jury. .

J'adresse mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance à Monsieur B. ROVEL Maître de conférences à l'Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, pour son appui et son aide efficace et constante, ainsi que pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.

Enfin je voudrais rendre hommage à tous mes camarades chercheurs et au personnel technique du laboratoire (sans oublier les anciens) pour leur aimable concours et leur bonne humeur constante.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I. Historique.....	3
II Composition chimique de la betterave sucrière.....	6
II.1. Composés inorganiques.....	6
II.2. Composés organiques.....	8
III. Technologie sucrière.....	16
III.1. Préparation des betteraves.....	18
III.2. Extraction du saccharose ou Diffusion.....	19
III.3. Epuration calco-carbonique.....	20
III.4. Evaporation.....	24
III.5. Cristallisation.....	25
IV. Les non sucres contenus dans les jus et les sucres.....	29
V. Interactions saccharose-eau-N.S. au cours de la cristallisation.....	34
BUT DU TRAVAIL.....	42

MATERIEL & METHODES.....	45
I. Matériel d'étude.....	46
II. Fractionnement des échantillons.....	46
II.1. Ultrafiltration.....	46
II. 2. Dialyse.....	47
III. Fractionnement chromatographique.....	48
III.1. Chromatographie d'échange d'ions.....	48
III.2. Chromatographie d'exclusion stérique.....	50
IV. Isolement des pigment sur Sep Pak C18.....	51
V. Chromatographie en phase gazeuse des sucres.....	52
V.1. Conditions opératoires.....	52
V.2. Hydrolyse.....	52
V.3. Silylation et analyse.....	53
VI. Dosage des sucres totaux (Méthode phénol sulfurique)(DUBOIS 1956).....	53
VII. Détermination du pouvoir réducteur.....	54
VIII. Détermination des acides uroniques par la méthode au méta- hydroxy-diphényl (MHDP).....	54
VIII.1. Hydrolyse.....	55
VIII.1.1. réactifs.....	55
VIII.1.2. mode opératoire.....	55
VIII.2. Dosage de des acides uroniques par la méthode au MHDP.....	55
VIII. 2.1. réactifs.....	55
VIII.2.2. mode opératoire.....	56

IX. Détermination de la teneur en matières sèches dans les sirops de sucre	57
X. Mesure du trouble	
néphélométrie.....	58
XI. Isolement des macromolécules par précipitation à l'alcool	58
XII. Fractionnement des résidus secs des pulpes de betteraves.....	59
XIII. Décoloration des pulpes par le peroxyde d'hydrogène	60
XIV. Dosage chimiques des -COOH libres totaux.....	61
XIV.1. Principe	
XIV.2. Mode opératoire.....	61
XIV.3. Dosage de l'azote	62
XIV.3.1. par la méthode de KJELDAHL.	62
a. principe	62
b. réactifs.....	62
c. mode opératoire.....	62
XIV.3.2. Par analyse élémentaire.....	63
XV. Rétention des cations par les pulpes.....	65
XV.1. Rétention des ions calcium.....	65
XV.2. Rétention des ions cuivre.	65
XVI. Détermination de la capacité d'échange des cations des pulpes	65
XVII. Extraction des lipides présents dans les pulpes.....	66

XVIII. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse.....	68
XVIII.1. Principe.....	68
XVIII.2. Matériels.....	69
XVIII.3. Préparation des échantillons.....	69

RESULTATS - DISCUSSION

CHAPITRE I.....	71
I. Introduction.....	72
II. Comparaison entre un EP2 d'Eppeville et un EP2 danois.....	74
II.1. Préparation des échantillons.....	74
II.1.1. ultrafiltration.....	74
II.1.2. Dialyse.....	75
II.2. Etude des fractions ultrafiltrées.....	75
II.2.1. Etude des fractions de poids moléculaires supérieurs à 10000 daltons.....	76
II.2.2. Etude des fractions de poids moléculaires comprises entre 2000 et 10000 daltons.....	78
II.2.3. Conclusion.....	78
III. Comparaison entre ultrafiltration et dialyse pour la récupération des macromolécules.....	80
IV. Etude du comportement d'un EP2 d'Eppeville vis à vis de résines Sepharose et Amberlite.....	81
IV.1. Fractionnement de l'afiltrat de l'EP2 d'Eppeville de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons.....	82
IV.2. Fractionnement de l'afiltrat d'EP2 d'Eppeville de poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 daltons.....	82

V. Etude comparative de l'EP2 déminéralisé par "Nouvelle déminéralisation" et l'EP2 non déminéralisé.....	84
VI. Comparaison d'échantillons issus de sucreries Danoise et Allemande et de la sucrerie d'Eppeville.....	86
VI.1. Chromatographie d'exclusion stérique.....	86
VI.1.1. Etude des sirops, des EP2 et des sucre roux	87
VI.1.2. Etude du système triphasique à partir d'un EP2 d'Eppeville.....	93
VI.2. Analyse des fractions F1 par chromatographie d'échange d'ions.....	95
VI.2.1. Répartition des macromolécules des fractions F1 provenant des sirops, EP2 et sucre roux d'Eppeville,danois et allemands.....	96
VI.2.2 Répartition des macromolécules des fractions F1 issues de la chromatographie sur Trisacryl des trois phases d'un système triphasique obtenu par dilution d'un EP2 d'Eppeville	102
VII. Isolement des substances colorées présentes dans un EP2 d'Eppeville	
sur cartouche apolaire Sep pak C18.....	104
VII.1. Elution de la fraction colorée sur échangeuse d'ions.	105
VII.2. Caractérisation de la fraction non retenue par la cartouche C18 Sep Pak	105
VIII.Influence des recyclages au cours du process.....	107
IX Etude de la dégradation thermique d'une solution de saccharose.....	112
X.Analyse chimique de certains composés isolés	115
XI. Conclusion.....	117
CHAPITRE II.....	120
I. Essais de relargages à l'alcool des EP2.....	122

II. Essais néphélométriques	124
III. Comportement néphélométrique des sirops, sucres roux et égouts pauvres.....	126
III.1. Sirops.....	127
III.2. Sucres roux.....	129
III.3. Egouts pauvres de 2ème jet (EP2)	130
III.4. Système triphasique	132
IV. Effets du pH sur le comportement néphélométrique de deux EP2	133
V. Effets sur la turbidité de différentes fractions isolées de non sucres d'EP2	136
V.1. Fraction C18 colorée rassemblant les pigments isolés sur cartouche Sep pak.....	136
V.2. Fraction d'EP2 dépourvue de pigments.....	138
VI. Incidence des fractions moléculaires et macromoléculaires d'un EP2 sur la turbidité.....	139
VI.1. Comparaison des fractions macromoléculaires F1 de deux EP2.	139
VI.2. Comparaison des fractions moléculaires F2 de deux EP2	141
VII. Incidence des polysaccharides de sirops de canne à sucre sur la turbidité	143
VIII. Conclusion.....	144

CHAPITRE III.....	145
.I Introduction	146
I.1. Les fibres.....	147
I.1.1. Extraction à l'oxalate.....	147
I.1.2. Traitement des pulpes à l'éthanol.....	148
I.2. Les pectines ou substances pectiques.....	149
I.2.1. Structure des pectines	149
I.2.2. Dégradation des pectines.....	150
a. dégradation chimique	150
b. dégradation enzymatique.....	151
I.3. Les polysides de la betterave	152
I.3.1. Hydrolyse chimique.....	152
I.3.2. Hydrolyse enzymatique.....	153
I.3.3. Influence des prétraitements sur le rendement de l'hydrolyse	154
a. prétraitements chimiques.....	154
b. prétraitements physiques.....	154
c. prétraitements enzymatiques.....	155
II. Incidence de la dégradation alcaline sur les pulpes de betteraves	155
II.1. Hydrolyse basique des pulpes de betteraves sucrière.....	157
II.2. Détermination des poids secs après hydrolyse basique.....	159
II.3. Dosage des sucres totaux et acides uroniques dans les filtrats	161
II.4. Fractionnement des résidus secs.....	163
II.5. Conclusion.....	166
III. Valorisation des pulpes sous forme de fibres alimentaires.....	167
III.1. Décoloration des pulpes de betterave	167
III.1.1 Influence du pH.....	168

4III.1.2. Evolution des teneurs en cellulose et en lignine dans les pulpes décolorées	169
III.1.3. Conditions optimales de décoloration des pulpes.....	170
III.1.4. Dosage du peroxyde d'hydrogène.....	172
III.1.5. Elimination du peroxyde d'hydrogène résiduel dans la pulpe décolorée.....	174
a. par lavage à l'eau	175
b. par traitement à l'hydrogénosulfite de sodium (NaHSO ₃).....	175
c par traitement à la catalase.....	175
III.1.6. Conclusion	176
III.2. Etude physico-chimique des pulpes blanchies.....	177
III.2.1. Etude du gonflement lors de la mise en contact avec l'eau.	178
III.2. 2. Rétention des cations métalliques par la pulpe.....	178
a. rétention des ions Ca ⁺⁺	179
b.. rétention des ions Cu ⁺⁺	180
III.3. Dosage chimique des -COOH totaux.....	181
III.3.1. Dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL.....	182
III.3.2. Dosage par analyse élémentaire.....	183
III.4. Détermination de la capacité d'échange des pulpes.	184
III.5. Détermination des polysaccharides dans les pulpes blanchies	187
III.6. Identification et teneurs en lipides.....	188
III.6.1. Lipides totaux	188
III.6.2. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.	188
III.7. Influence des fibres sur l'activité lipasique.....	190
III.8.Pulpes micronisées de betterave.....	191
III.8.1. Matière sèche des pulpes micronisées	192
III.8.2. Masse spécifique des pulpes micronisées.....	193
III.8.3. Pouvoir gonflant.....	194
III.8.4. Déterminations de la teneur en fibres alimentaires.....	196
III.8.5. Conclusion	197

III.9. Délipidation des pulpes de betteraves.....	197
III.9.1. Extraction des lipides.....	197
III.9.2. Conclusion.....	203
CONCLUSION.....	204
BIBLIOGRAPHIE.....	211

INTRODUCTION

Synonyme de plaisir pour certains, pour d'autres, simple produit de consommation courante, au même titre que la lessive ou le dentifrice, le sucre tient une place importante dans notre alimentation quotidienne. Vingt deux kilos par personne et par an en 1935, environ 35 kilos en 1974: La consommation a augmenté de 500% depuis le début du siècle pour se stabiliser à un niveau élevé. C'est une des matières premières essentielles de l'industrie alimentaire. On ne compte plus les produits sucrés, de la confiserie aux boissons rafraîchissantes, des pâtisseries aux crèmes desserts, jusqu'aux conserves de petits pois qui l'utilisent comme additif. Malgré la vogue récente des produits allégés et des édulcorants, ces petites douceurs que l'on s'offre gardent tout leur charme. On imagine mal qu'il y a seulement 350 ans la majeure partie des Européens ignoraient totalement leur existence.

Le saccharose est de loin le sucre le plus fréquemment utilisé dans les produits alimentaires et on peut ajouter qu'un grand nombre de ces produits doivent leurs caractéristiques organoleptiques et texturales à sa présence.

I. Historique

Depuis les temps les plus reculés, le sucre n'était connu ou plutôt n'apparaissait que comme un produit rare et exotique, aux seuls fins médicinales. L'édulcorant de base était le miel. Mille ans avant Jésus-Christ une production sucrière artisanale existait en Inde. La canne à sucre premier végétal utilisé pour la production du saccharose est originaire du Bengale. C'est grâce aux armées d'Alexandre le Grand, ayant atteint l'Inde vers 325 ans avant J.C. que le peuple d'occident apprit son existence. Néanmoins, il reste pendant fort longtemps un article de grand luxe que seuls les gens riches peuvent s'offrir, jusqu'à ce que les Arabes au septième siècle entreprennent de l'acclimater dans les pays méditerranéens.

Quand les Arabes se lancèrent, vers 650, à la conquête des rivages méditerranéens, ils emportèrent avec eux la canne, qui fut introduite en Egypte et jusqu'en Andalousie, où elle est toujours cultivée; ce sont les seules plantations de canne à sucre en Europe. Mais il n'y avait que fort peu de contact entre le monde chrétien et le monde arabe, et le sucre restait inconnu dans les nations européennes. Ce contact eut lieu au 12^{ème} siècle avec les croisades, et des croisés apportèrent cette nouveauté: Le sucre cristallisé, baptisé sel indien (on appelait sel tous les composés cristallisés). Le commerce sucrier se développa et Venise devint la grande capitale sucrière de l'Europe où naquit au 15^{ème} siècle l'industrie européenne du

raffinage. La découverte du Nouveau Monde marque un tournant dans l'histoire du sucre puisque C.Colomb introduit des plants de canne à Saint Domingue qui deviendra par la suite le berceau de la production sucrière du continent américain. Ce n'est que dans la première moitié du 16^{ème} siècle que les Français qui s'étaient installés en Martinique et en Guadeloupe entreprennent d'y cultiver la canne.

Au 18^{ème} siècle, la production se normalise et les prix baissent; la consommation, bien que très faible comparée à celle de nos jours, se développe. Quelques 125000 tonnes en 1745, produites par la France et exportées en partie sur l'Europe, contre 1900000 tonnes consommées actuellement par an pour la France seule. A la veille de la Révolution, la France a acquis la première place dans le commerce et le raffinage du sucre en Europe. Cependant, pendant la Révolution de 1789, une longue période de guerre paralyse le commerce français du sucre, entièrement tributaire du transport maritime, le commerce avec les pays d'outre mer demeure extrêmement difficile, le blocus anglais répondant au blocus continental de Napoléon. Toute l'Europe, qui commençait à prendre l'habitude de consommer du sucre en manque brusquement. C'est alors que l'on voit apparaître une nouvelle forme d'industrie sucrière, celle de la betterave, dont le produit sera dans ses débuts nommé "sucre indigène" pour bien marquer son origine locale.

La présence dans la racine de betterave d'un sucre identique à celui de la canne, le saccharose, était connue depuis longtemps, Olivier de Serres le signale en 1600 dans son "Théâtre de l'agriculture". En 1745 un chimiste berlinois Andreas Marggraf publie ses recherches sur la présence de sucre dans diverses racines, et notamment dans la betterave. F. Achard, élève de Marggraf reprend quelques années plus tard les expériences de celui-ci et construit une première usine, c'est le premier qui a séparé l'extraction et la purification (Baxa,et col)(1967)

La production de sucre de betterave commence à se développer à l'échelle industrielle vers 1800. En Janvier 1812 Benjamin Delssert présente à l'Empereur le premier pain de sucre de betterave. A cette époque on peut compter 40 usines avec une production globale de 14000 tonnes. La France devient en 1875 le premier producteur européen avec 45000 tonnes. Actuellement ces chiffres atteignent les cent millions de tonnes (Figure1). La France est le deuxième producteur mondial de sucre de betterave.

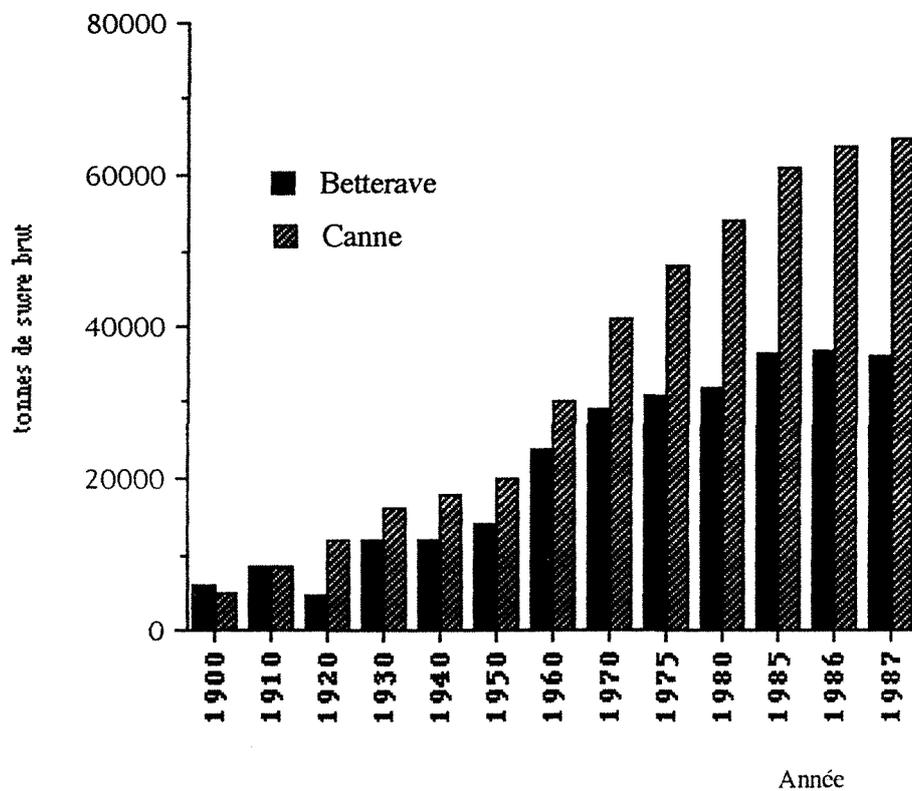


Figure 1: Evolution de la production mondiale du sucre de 1900 à 1987 en milliers de tonnes de sucre brut par campagne (d'après les statistiques S.O Light).

II Composition chimique de la betterave sucrière.

La betterave à sucre, (*Beta vulgaris L.*), végétal autotrophe utilise le gaz carbonique et l'eau selon le cycle de la photosynthèse pour sa croissance. Cette réaction s'effectue au niveau des chloroplastes, elle est catalysée par la lumière solaire. Le résultat de cette réaction est la synthèse de glucides dont le saccharose est le principal représentant, synthétisé dans les feuilles, ce dernier est véhiculé par les pétioles et stocké dans les vacuoles des cellules du sillon saccharifère de la racine. Ainsi, la betterave à sucre est originale parce qu'elle emmagasine une grande quantité de saccharose alors que dans la plupart des plantes l'amidon constitue la substance de réserve la plus commune.

La composition chimique de la betterave à sucre est fonction de sa variété génétique, des facteurs agronomiques, des conditions de végétation et des infrastructures de la récolte (Carruthers et col.)(1965) (Zielke)(1970). La racine de la betterave comporte une armature cellulosique et pectique insoluble, constituant principal des membranes cellulaires; que l'on trouve dans le marc. L'extrait sec de la racine représente environ 25% de son poids et comprend outre le marc, les matières sèches dissoutes dans l'eau. Ces substances dissoutes sont minérales ou organiques. La betterave à sucre comporte aussi une phase liquide, ou suc cellulaire, très riche en eau, soit environ 75% du poids de la racine (Mc Ginnis)(1982).

II.1. Composés inorganiques

Ces composés inorganiques représentent environ 0,5% (p/p): Le

potassium, le calcium, le magnésium et le sodium sont les cations les plus importants qu'on trouve dans la betterave. En ce qui concerne les anions on cite fréquemment les phosphates, les chlorures et les sulfates. Ces éléments sont représentés dans le tableau 1 (Mc Ginnis)(1982) (Devillers)(1981).

Saillard d'une part, H. Collin d'autre part (Dubours)(1952), sont parvenus à décèler certaines corrélations entre la richesse en sucre d'une racine de betterave et sa teneur en cendres, par comparaison de betteraves fourragères et de betteraves à sucre.

Composés	Teneur dans la betterave (%)	Teneur par rapport aux autres éléments (%)
K ₂ O	0,25	42
Na ₂ O	0,05	08
CaO	0,08	13
MgO	0,08	13
P ₂ O ₅	0,09	15
SO ₃	0,02	3
Al ₂ O ₃	0,01	2
SiO ₃	0,01	2
Cl	0,01	2
Total	0,60	100

Tableau 1: Composés inorganiques présents dans la betterave

(Mc Ginnis)(1982).

* N.B. les métaux ne sont pas présents dans la betterave sous forme d'oxydes, ils ont été convertis sous cette forme pour l'analyse.

Alors que les premières contiennent jusqu'à 12% de cendres par rapport à la matière sèche, on n'en trouve que 3% dans les autres. Par ailleurs les principales raisons de diminution de la qualité des betteraves sont liées à l'emploi excessif des engrais (Kofodnielsen et col.)(1980). Les engrais provoquent une diminution de la pureté du jus, due à l'absorption accrue d'azote, de potassium et de sodium.

II.2. Composés organiques

La racine de la betterave contient une teneur en saccharose qui varie de 13% à 22% (p/p). Cette molécule est constituée de glucose et de fructose reliés par une liaison osidique β 1-2 d'énergie élevée. Le saccharose est un sucre non réducteur très soluble dans l'eau, instable thermiquement en solution aqueuse. Par hydrolyse acide il se scinde en deux molécules d'hexoses, le α D glucose ou α D glucopyranose et le β D fructose ou β D fructofuranose, par contre en milieu basique le saccharose forme des saccharates.

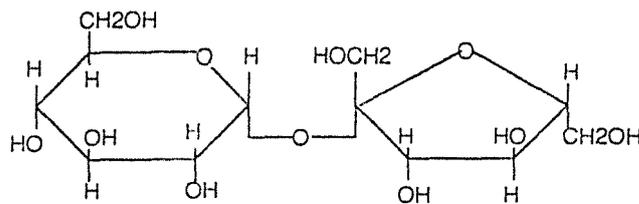


Figure 2: Structure de la molécule de saccharose (C₁₂H₂₂O₁₆).

On a pu identifier d'autres glucides dans la betterave notamment le glucose et le fructose à raison de 0,05% , lorsque la betterave en contient plus de 0,1% (Dubours)(1952) ils proviennent de la dégradation du saccharose pendant le stockage des racines . Ces glucides jouent un rôle non négligeable dans les réactions de dégradation, sur ce sujet, plusieurs travaux ont été publiés, on cite à titre indicatif (Kieboom et Vanbekkeum)(1985) (Speck,)(1958) (Mauch)(1971). Parmi ces réactions de dégradations on peut citer, la dégradation des sucres réducteurs en milieu alcalin qui conduit à la formation de trioses (glycéraldéhyde, dihydroxyacétone)

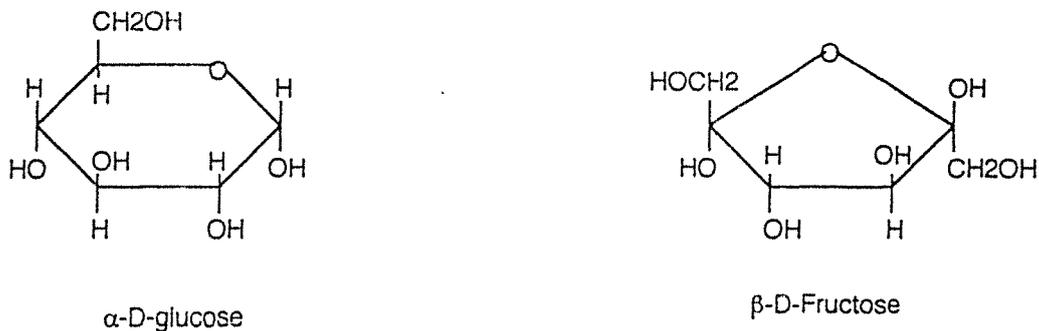


Figure 3: Structure de la molécule de α -D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$) et de la molécule β -D-fructose.

On trouve également dans la betterave comme sucre simple à l'état de traces le galactose et l'arabinose:



Figure 4: Structure de la molécule de α -D- arabinose ($C_5H_{10}O_5$) et de la molécule de β -D- galactose ($C_6H_{12}O_6$).

Le raffinose est le principal triholoside qu'on trouve dans la betterave, sa teneur est de l'ordre de 0,3 à 1,2% (5). Il interfère avec la cristallisation du saccharose (Aitamar)(1980), provoquant un retard du taux de croissance cristalline le long de certains axes cristallographiques. Une étude récente (Liang et col.)(1988) a montré que le raffinose en concentration élevée affecte la solubilité du saccharose. On a isolé aussi des trisaccharides: les kestoses formés d'une molécule de saccharose sur laquelle vient se lier un résidu fructosyle. On trouve aussi dans la betterave le stachyose (raffinose lié à une molécule de galactose pour former un tétrasaccharide), cette molécule a été isolée en faible quantité dans la mélasse.

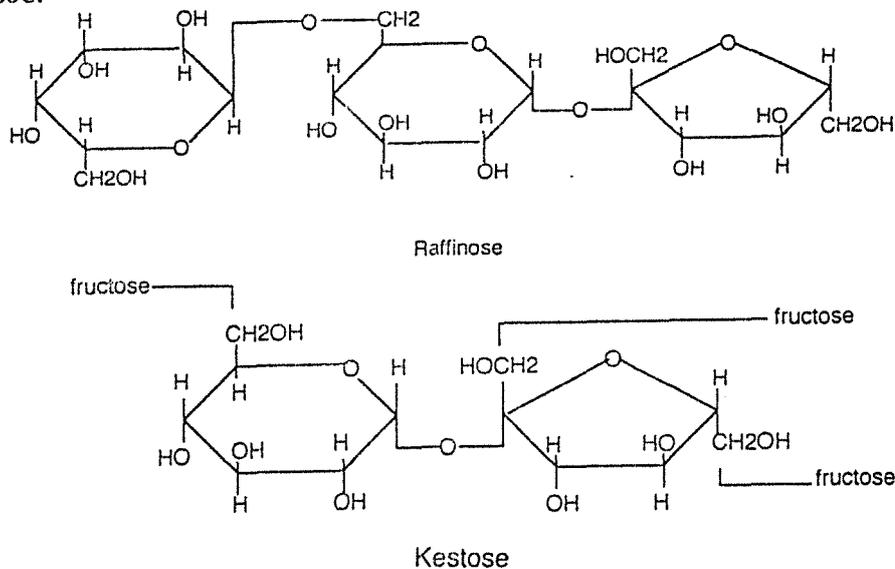


Figure 5: Structure des molécules de raffinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) et de kestose ($C_{18}H_{32}O_{16}$).

La cellulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$ polyoside de structure a été identifiée dans la membrane cellulaire de la betterave, c'est un polymère constitué d'au moins 3000 unités glucopyranose (Coultate)(1988) reliées par des liaisons β 1-4. C'est un constituant de la paroi squelettique des cellules. Chimiquement la cellulose est relativement inerte, elle est insoluble dans

l'eau et constitue 26 à 27 % du marc de betterave (Gaertner)(1919).

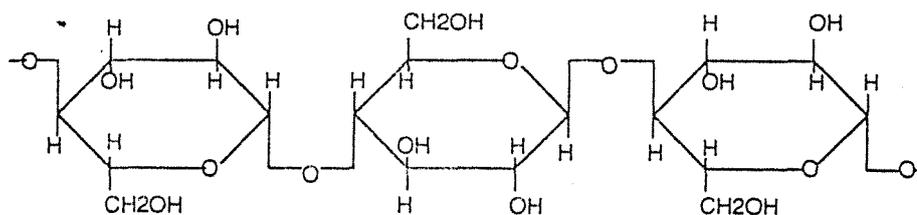


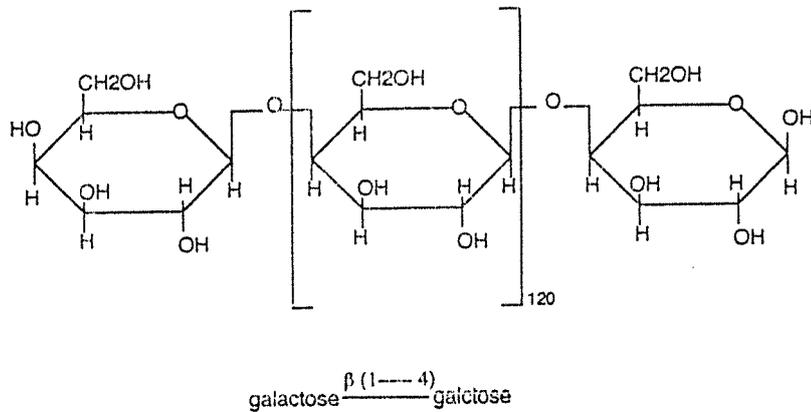
Figure 6: Structure de la molécule de cellulose.

La lignine est une molécule sans aucune valeur alimentaire, on la retrouve intégralement dans les pulpes de betterave, c'est un polymère insoluble dans l'eau quel que soit le pH. La lignine colmate les espaces interfibrillaires de la cellulose et renforce la solidité de la paroi squelettique des cellules.

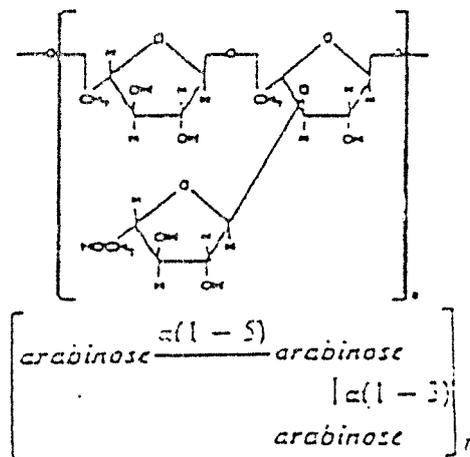
Les substances pectiques sont localisées dans les membranes cellulaires, et constituent un véritable ciment cellulaire qui permet de faire la jonction entre deux cellules contigues. On trouve les hémicelluloses, les galactanes (chaîne d'environ 120 unités de galactopyranose liées en β 1-4) et les arabanes (chaines courtes ramifiées composées d'unités d'arabinofuranose liées en α 1-5, un arabinose sur deux étant lui même lié à une autre molécule d'arabane d'une autre chaîne par une liaison α 1-3). Ces hémicelluloses sont solubles en solution alcaline. La matière pectique renferme 25 à 30% d'arabanes, on y trouve aussi des galactanes aux quels viennent s'ajouter des galacturonanes, chaines hautement polymérisées constituées d'acides uroniques (acides polygalacturoniques) leurs teneurs dans la betterave varie selon le degré de maturité de 2,5 à 10% de la matière sèche. (Figure 7)

(Phatak et col.) (1988) ont mis en évidence après extraction des pulpes de betterave la dominance de l'acide galacturonique, l'arabinose et du galactose

dans la structure des pectines, à côté de petites quantités de glucose et rhamnose. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par d'autres chercheurs (Mc Cready)(1966), (Wen et col.)(1988) (Dea et Madden)(1986). Ajoutons que les mêmes molécules ont été trouvées dans la canne à sucre



Galactane



Arabane

Figure 7: Structure de deux composés de pectine rencontrés dans la betterave.

Les galacturonanes sont de loin les composés les plus importants des matières pectiques. Un certain nombre de leurs groupements carboxyliques sont estérifiés par des groupements méthyles, alors que les autres sont salifiés par du calcium ou du magnésium

Dans la betterave, on trouve également des lipides en très faible proportion, 0,01% (Neville)(1912). Cette fraction lipidique est constituée d'acides gras dont l'acide oleique, des phytostérols insaponifiables caractérisés par un noyau phénanthère insaturé, et des lécithines qui en milieu alcalin, peuvent être saponifiées et libérées ainsi que des sels d'acides gras, de l'acide phosphorique et de la choline.(Figure 8)

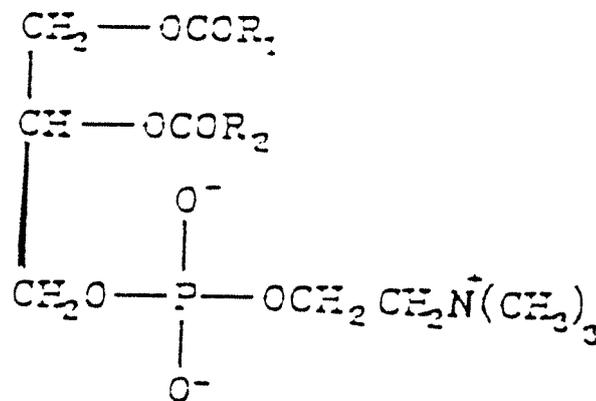


Figure 8: Structure des lécithines.

La betterave contient aussi des saponines qui sont formées d'un triterpène pentacyclique relié par une liaison glycosidique à l'acide gluconique (Ehlich, et Rehorst)(1925) (Haar)(1927). Les saponines jouent un rôle protecteur vis à vis des tissus externes de la betterave contre les micro-organismes.

Les solutions aqueuses de saponines sont caractérisées par une faible tension de surface. Leur teneur est déterminée par la méthode de WALKER: réaction colorimétrique avec le pentachlorure d'antimoine après concentration des saponines par floculation acide (Devillers et col.)(1968)

.Les saponines en milieu relativement acide sont insolubles et ont tendance à précipiter avec les métaux lourds (Figure 9)

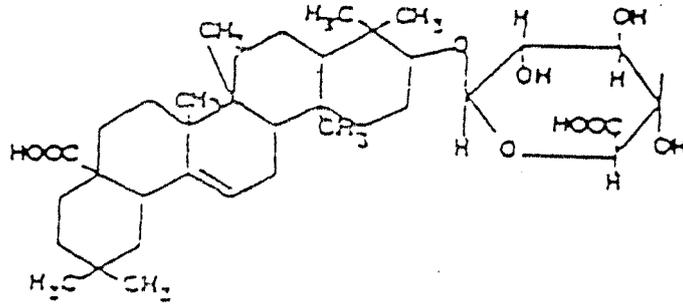


Figure 9: Structure des Saponines

Plusieurs auteurs se sont intéressés à ces saponines et à leurs effets sur la production de sucre. Eis et col.(1952), ont été les premiers à montrer que les saponines sont responsables de la formation de flocculats dans les sirops de sucre issus de betterave sucrière.

On a pu détecter dans la betterave la présence d'acides organiques en faible proportion. Ils ont un rôle tampon, et permettent ainsi de maintenir une valeur de pH adéquate, nécessaire au bon développement de la plante. Cependant une grande partie est produite lors du procédé d'extraction qui provoque la dégradation d'un certain nombre de structures organiques. Les acides malique, citrique, lactique et fumarique, proviennent directement de la betterave, par contre les acides formique, acétique, oxalique etc, souvent formés au cours de la décomposition du saccharose.

Les composés organiques azotés représentent au moins 1% de la betterave, leur teneur est très dépendante des conditions de culture (fertilisation), de la variété sélectionnée et du patrimoine génétique. Dans cette famille, les protéines et leur produits de dénaturation sont les

principaux représentants. Le tableau 2 résume les substances azotées typiques de la betterave à sucre et leur teneur.

Les acides aminés, tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique sont largement présents dans la betterave. La glutamine peut être convertie en milieu alcalin et à chaud en acide pyroglutamique. Les acides aminés jouent un rôle très important dans la formation des produits dits "bruns" responsables de la coloration des sirops de sucre. Ainsi la condensation de ces amino-acides avec des sucres réducteurs tels que le glucose (aldose) ou le fructose (cétose), conduit à la formation de pigments bruns, cette réaction a été mise en évidence pour la première fois par Maillard (Maillard)(1916). Après ce dernier, plusieurs auteurs se sont intéressés à cette réaction, c'est le cas de (Hodge)(1953) (Reynolds)(1965) (Hashiba)(1982). Ajoutons que Payne et col.(1970) ont mis en évidence dans les feuilles de betteraves la dopa (2,4 dihydroxyphenylalanine) qui est le plus important acide aminé, qui joue probablement un rôle de résistance contre les lésions du végétal.

La bétaine composé organique que l'on ne trouve pratiquement que dans la famille des Chenopodiacees (Marry et col.)(1962) est présente dans la betterave à raison de 0,1% (Mc Ginnis)(1982), son rôle métabolique n'est pas connu par contre sa stabilité chimique est remarquable : la bétaine résiste aux conditions chimiques les plus extrêmes. On trouve aussi comme composés organiques azotés des bases puriques et pyrimidiques (1 à 2%), constituants des acides nucléiques que l'on trouve essentiellement au niveau du noyau cellulaire. Ces solutions sont toutes légèrement solubles en solution aqueuse alcaline.

En ce qui concerne les composés polyphénoliques, les travaux de Haluk et col.(1986) ont montré que la betterave sucrière contient essentiellement de la dopamine, de l'acide paracoumarique, de l'acide

ferulique et du gaïcol à l'état libre. Ils ont mis en évidence des acides phénoliques engagés dans des fonctions esters, c'est le cas par exemple de l'acide férulique, mais également de l'acide parahydroxybenzoïque qui est engagé dans des liaisons hétérosidiques.

composés azotés	% dans la betterave
Amino-acides	0,042
Amides	0,015
Ammoniac	0,005
Nitrates	0,002
Protéines	0,115
Bétaine et choline	0,02
Purines	0,001
Total	0,2

Tableau 2: Substances azotées typiques de la betterave (Mc Ginnis)(1982).

III. Technologie sucrière

Dans cette partie, nous allons essayer d'exposer les différentes étapes qui constituent le schéma général de fabrication. Il faut noter que le procédé de fabrication doit respecter les objectifs actuels de l'industrie

sucrière qui sont :

- d'extraire de la betterave le maximum de sucre
- de produire un sucre d'une qualité répondant à la demande des consommateurs avec un prix de revient minimum
- enfin il ne faut pas oublier le côté pollution cet objectif doit répondre à des impératifs qui concernent notamment l'environnement.

On peut résumer les procédés de fabrication en cinq étapes essentielles:

- préparation des betteraves
- extraction du saccharose
- épuration calco-carbonique
- évaporation
- cristallisation

Ces étapes se déroulent successivement et sans interruption durant une période qu'on appelle la campagne d'extraction d'une durée de trois mois, c'est à dire de début octobre à fin décembre . C'est une période qui est extrêmement dure pour l'industrie sucrière car une fois que la betterave est récoltée elle doit être traitée rapidement pour éviter les pertes en sucre par destruction microbologique et enzymatique (Deruy et col.)(1989). Dans ces conditions le tonnage journalier en betteraves transformées varie de 5000 à 20000 tonnes par jour et par usine.

III.1. Préparation des betteraves

Au moment où les betteraves sont livrées à la sucrerie, il est nécessaire de déterminer la quantité nette de betteraves livrée, ainsi que leur teneur moyenne en sucre. Ces données permettent notamment de rémunérer correctement le fournisseur en fonction de la qualité de sucre livrée et de connaître avec un minimum de précision le bilan des matières entrant dans la sucrerie. La quantité de betteraves livrées est estimée selon deux méthodes:

- soit par pesée directe au centre de réception de l'usine
- soit par pesée géométrique (récolte achetée sur pied par la sucrerie par prélèvement au différents points du champ de culture)

La teneur en sucre est déterminée par mesure polarimétrique, cette teneur peut atteindre 17 grammes de sucre pour 100 grammes de betteraves. Les betteraves vont subir un lavage, opération importante nécessitant une grande quantité d'eau. Le système de lavage est constitué généralement par un cylindre horizontal tournant sur lui-même soulevant les racines à l'aide de bras, les laissant retomber dans l'eau. Ensuite un dispositif de rinçage à jet d'eau sous forte pression permet d'éliminer la terre restée collée dans les sillons saccharifères. Ainsi les betteraves sont débarrassées de la terre, des pierres et des herbes. Une autre pesée des betteraves propres permet de connaître le poids de racines entrant effectivement en fabrication.

Afin de faciliter l'extraction du jus de betteraves, ces dernières sont découpées en fines lamelles relativement rigides appelées cossettes. La performance de la diffusion dépend en grande partie de la dimension des cossettes

III.2. Extraction du saccharose ou Diffusion

L'objectif est d'extraire le maximum de saccharose avec le minimum d'impuretés. Environ 64% du saccharose présent dans la cellule végétale est stocké dans la vacuole qui est entourée d'un protoplasme: membrane perméable seulement à l'eau. La diffusion est effectuée à une température comprise entre 70°C et 80°C pour pouvoir dénaturer le protoplasme à une température élevée. Le principe de l'extraction du saccharose est basé sur les lois générales de la diffusion: une fois que les cossettes sont mises en contact avec l'eau chaude les molécules diffusent graduellement des zones de forte concentration vers les zones de faible concentration (Figure 9)

En France la diffusion continue horizontale (RT) est la plus utilisée: le diffuseur est un long cylindre rotatif de plusieurs dizaines de mètres, constitué d'un certain nombre de compartiments hélicoïdaux qui facilitent l'entraînement des cossettes circulant en sens inverse du courant d'eau chaude. Le jus sucré sort à l'extrémité du cylindre tandis que les cossettes épuisées sont recueillies sous forme de pulpes, la plus grande partie des impuretés est transportée avec la pulpe, tandis qu'une partie non négligeable est entraînée dans le jus de diffusion (Goodban et Stark)(1962) (Gorzanwsky et Bartholomae)(1961). Le pH du jus de diffusion se situe aux alentours de 6. (Ponant et col.)(1988) ont travaillé sur l'extraction du sucre des betteraves, leur procédé consiste en un traitement au préalable des cossettes au moyen de mono-saccharate de calcium, ce traitement conduit à des jus épurés de meilleure qualité.

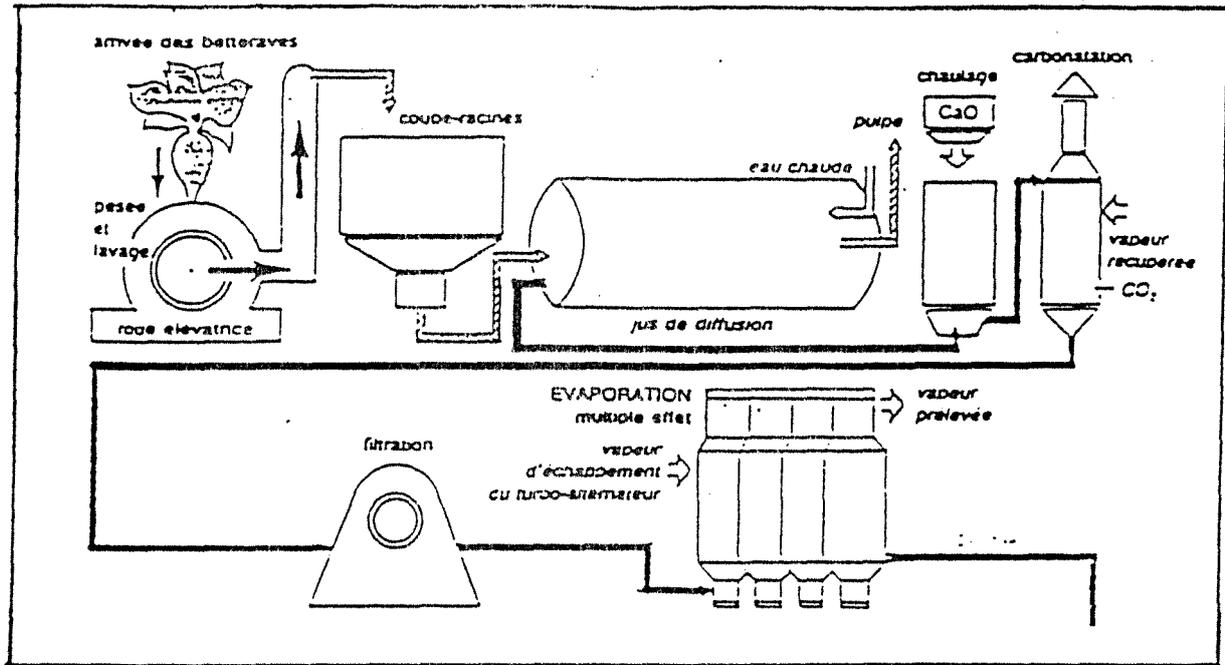


Figure 10: Schéma d'extraction du sucre de betterave.

III.3. Epuration calco-carbonique

Elle consiste en une purification chimique du jus de diffusion, ceci permet d'obtenir un jus relativement stable à haute température et dépourvu d'un certain nombre de particules indésirables qui ont pour effet d'entraver la cristallisation du sucre.

Composition du jus brut ou jus de diffusion. (S.S.E.C. Manuel de sucrerie)(1979)

1. Sucre.
2. Matières minérales dissoutes:

potassium

sodium

calcium

magnesium

phosphates, sulfates, etc...

silice, fer, aluminium, etc...

3. Matières organiques non azotées dissoutes:

acide oxalique, acide citrique, acide malique.

sucre inverti, colorants

4. Matières organiques azotées dissoutes:

amides

amines

bétaines

5. Matières organiques azotées et colloïdales:

protéines, gommages, pectines.

Industriellement, la chaux constitue l'agent de défécation le plus utilisé, aussi bien en sucrerie de betterave que de canne, cela inclus un traitement à la chaux du jus de diffusion. Dans ces conditions un certain nombre d'impuretés vont précipiter, la chaux en excès est éliminée par addition de dioxyde de carbone (formation d'un précipité de carbonate de calcium). La chaux utilisée pour l'épuration est produite à partir de pierre calcaire et de coke par les sucreries elles mêmes, est souvent utilisée sous forme de suspension dans une solution aqueuse légèrement sucrée pour favoriser la solubilisation de la chaux : c'est ce qu'on appelle le lait de chaux.

Au cours de la première phase du processus d'épuration ou préchaulage: on introduit progressivement une petite quantité de lait de chaux dans le jus de diffusion de façon à coaguler les matières colloïdales sous forme irréversible. Cette précipitation nécessite des quantités de chaux de l'ordre de 0,25 gramme pour 100 ml de jus.

Au cours du préchaulage, le premier rôle de la chaux est de neutraliser l'acidité, ainsi le pH passe de 6 à 11,5 en préchaulage, les acides oxalique, tartrique et citrique donnent des sels de calcium qui sont partiellement ou totalement insolubles. La précipitation de ces acides est rapide et ne nécessite pas une grande concentration en chaux. En ajoutant progressivement la chaux au cours du préchaulage, on assiste à un accroissement de l'alcalinité. Au cours de cette opération on élimine le maximum de protéines qui pourraient à un stade ultérieur affecter la vitesse de cristallisation du saccharose par adsorption sur les faces du cristal.

Le préchaulage est suivi d'une addition en continu de chaux : le chaulage, cette opération génère des réactions entre la chaux et les impuretés. Le pH passe de 11,5 en préchaulage à 12 en chaulage. L'addition massive de chaux au cours du chaulage entraîne des réactions de dégradation importantes, on assiste à des réactions de déamidation des amides (glutamine et asparagine), à la formation de sels d'ammonium, ainsi qu'à la libération d'ammoniaque dont une partie se dégage dans l'air et l'autre partie se dissout dans le jus et sera éliminée soit à l'évaporation soit à la cuisson.

On assiste aussi à la formation de saccharate de calcium qui favorise la solubilisation de la chaux, cependant une augmentation de pH provoque dans le cas du raffinose la formation de saccharates insolubles. La cellulose et la lignine sont retrouvées dans les écumes de carbonatation. Les hemicelluloses: arabane et galactane libèrent en solution alcaline diluée des réducteurs (galactose, arabinose) pouvant donner des réactions de

dégradation avec formation de produits colorés. Les acides aminés forment soit des sels calciques d'acides-amino qui sont solubles et subsistent dans les jus comme impuretés, soit ils génèrent des réactions de dégradation (réaction de Maillard).

Les matières pectiques sont hydrolysées en milieu basique et à chaud et donnent de petites unités dont l'acide pectique insoluble en milieu calcique alcalin.

Les acides gras, produits de dégradation des lécithines sont éliminés lors de la purification. Les phytostérols restent en solution et se retrouvent dans la mélasse. La bétaine est insolubilisée en partie par la chaux, toutefois une quantité non négligeable reste en solution dans les jus, et se retrouve dans la mélasse. Les saponines qui sont solubles à pH élevé sont éliminées à raison de 97% à l'épuration, cependant la faible quantité qui reste est à l'origine de l'apparition de mousses dans les bacs de chaulage (Deville et col.)(1986)

La troisième opération est la carbonatation qui constitue l'étape d'épuration et consiste comme son nom l'indique en l'introduction de CO_2 . Le but de cette opération est de tirer parti de l'insolubilisation du carbonate de chaux pour éliminer aussi complètement que possible, par action du CO_2 , l'impureté que constitue la chaux dissoute, laissée dans le jus chaulé. Le carbonate de calcium (CaCO_3) ainsi formé possède également la propriété d'absorber une grande partie des non-sucre et des colorants, et à donc un effet épurant. En outre il constitue un excellent adjuvant de filtration. Enfin par l'abaissement du pH qui passe de 12 pendant le chaulage à 11,2 pendant la première carbonatation et à 9,25 pendant la deuxième carbonatation, le CO_2 décompose les saccharates en libérant le saccharose

On ne peut pas ajouter tout le CO_2 en une seule fois car les colloïdes floculés se dissolvent à un pH trop bas. On ajoute donc une première

quantité de CO₂ (première carbonatation) jusqu'à l'obtention d'un jus filtrable, puis on filtre pour éliminer les colloïdes. On ajoute alors une quantité supplémentaire de CO₂ (deuxième carbonatation) pour éliminer le maximum de chaux dissoute, une filtration permet d'éliminer le précipité de CaCO₃ et les produits insolubles. Les précipités agglomérés sur les toiles des filtres constituent les écumes de carbonatation. Après lavage ces résidus sont récupérés et utilisés en agriculture comme amendement calcaire.

Pour minimiser un développement ultérieur des réactions de coloration la seconde filtration peut être suivie d'une sulfitation (addition de dioxyde de soufre). La décoloration des sirops par le SO₂ est d'un emploi bien connu (Mc Ginnis)(1982). Les matières colorantes exercent des effets néfastes sur les processus de fabrication, sur le rendement et la qualité du sucre produit. Les problèmes qu'elles entraînent a stimulé des recherches sur les causes, les mécanismes et la prévention de leur formation. Pour éliminer les sels résiduels et pour décolorer les jus, on fait passer ce dernier sur des résines échangeuses d'ions. Ainsi avant l'évaporation la pureté du jus est voisine de 93%, sa couleur est jaune paille et il contient:

- 86% d'eau
- 13% de saccharose
- 1% d'impuretés.

III.4. Evaporation

L'évaporation est la phase de fabrication qui suit immédiatement l'épuration et qui a pour but de concentrer le jus épuré par évaporation de la plus grande partie de l'eau qu'il contient. L'évaporation

s'effectue sous vide de façon continue dans une série d'évaporateurs à multiples effets. Le premier évaporateur fonctionne sous pression à une température proche de 130°C. La vapeur dégagée par celui-ci est utilisée pour chauffer l'évaporateur suivant et ainsi de suite. Ce qui fait que la température diminue progressivement jusqu'à 90°C, la dernière évaporation s'effectue sous vide. Par ce procédé le jus alcalin perd une partie de ses gaz dissous, en particulier l'ammoniac provenant des produits azotés de la betterave. On obtient ainsi un jus concentré d'environ 70% de matières sèches ou BRIX. Ce jus concentré est appelé Sirop vierge.

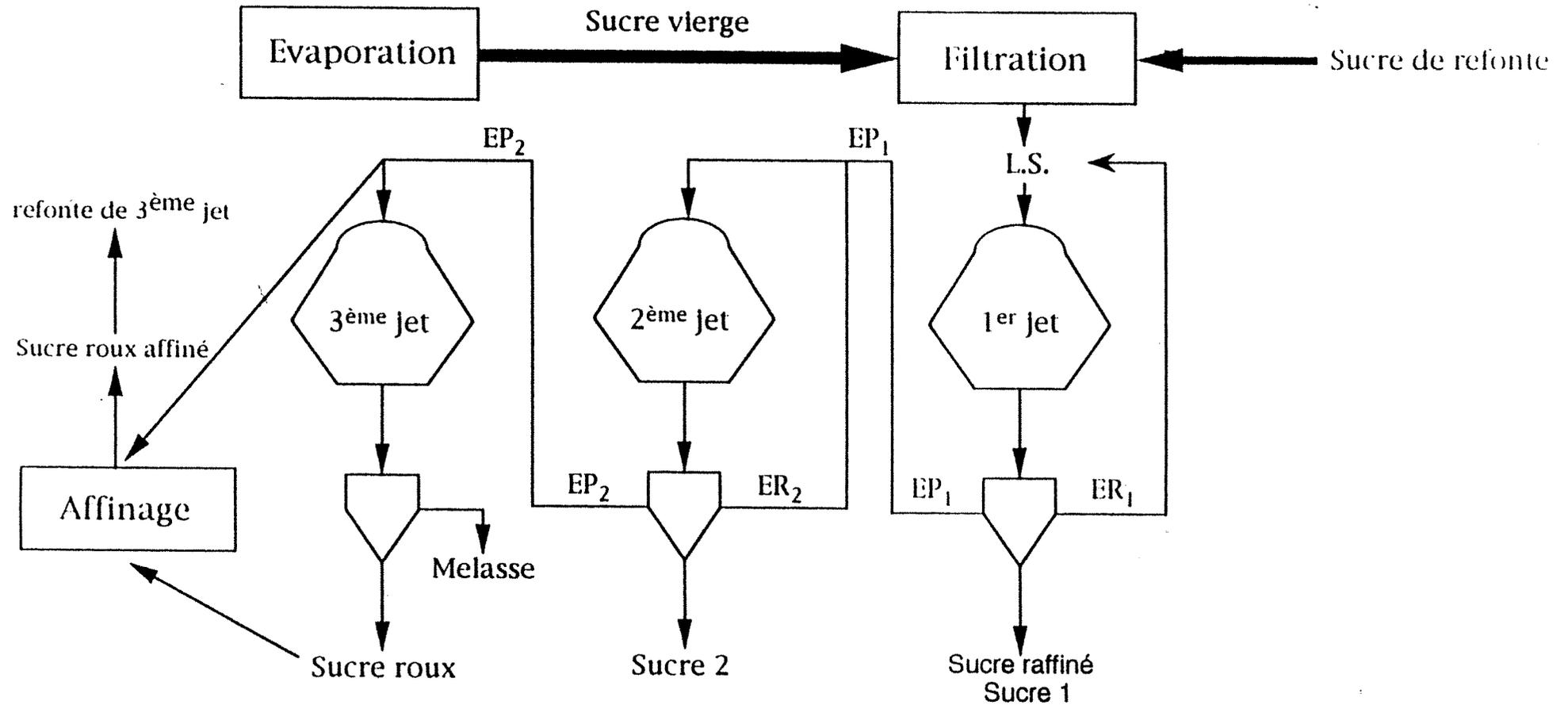
III.5. Cristallisation

La cristallisation est développée à partir du sirop vierge: le sucre est éliminé de la solution concentrée sous forme de cristaux, les impuretés se concentrent au fur et à mesure pour former finalement une solution résiduelle épuisée, la mélasse. C'est à ce niveau que les impuretés libérées lors de la diffusion et non éliminées en épuration ont l'impact le plus marqué, avec les conséquences qui en résultent, sur la qualité de sucre.

Le sucre est cristallisé dans des appareils à cuire afin d'éviter l'inversion de saccharose et la formation de caramel. La cristallisation se fait en général de manière fractionnée en trois étapes ou jets (Figure 11).

On enrichit le sirop à l'aide de refontes et de différents sucres pour constituer la liqueur standard (L.S.). Cette liqueur standard est ensuite concentrée sous vide (afin d'éviter la caramélisation) jusqu'à la saturation.

La cristallisation consiste alors à maintenir cette saturation en continuant à évaporer de l'eau sous vide, de façon à développer les cristaux à partir de petits cristaux (inférieur à 10 microns) introduits au cours de la



L.S. = Liqueur Standard
 E.R. = Egout Riche
 E.P. = Egout Pauvre

Figure 11; Schéma simplifié de la cristallisation

cuite, lors de l'ensemencement. La semence est obtenue en broyant des cristaux de saccharose. Les germes ainsi présents grossissent et ces cristaux enrobés d'une pellicule colorée (eau mère ou égout) dans laquelle se sont concentrées les impuretés forment ce que l'on appelle la "masse cuite".

En fin de cuisson, la masse cuite est déversée dans un malaxeur où elle continue à cristalliser tout en refroidissant. Une centrifugation à 1500 tours par minutes permet dans un premier temps de libérer les cristaux de la plus grande partie des eaux mères: "égout pauvre" ou EP2, qui les enrobaient, une pulvérisation de vapeur et d'eau permet ensuite de séparer ces cristaux de la dernière couche d'eau qui les enrobe, on récupère un sucre parfaitement blanc (= sucre 1) et une solution très sucrée (Egouts riches de 1er jet = ER1) qui est remontée en tête pour former la Liqueur Standard(L.S.) (Figure 11). L'eau mère chassée de la turbine contient encore en solution une très forte proportion de sucre, cet égout pauvre de premier jet (EP1) est repris en fabrication, Il subit alors une nouvelle cuisson. Après centrifugation et clairçage on obtient le sucre 2, un égout pauvre (EP2) et un égout riche (ER2). Le procédé est répété en 3^{ème} jet à partir des égouts de deuxième jet; après turbinage on obtient un sucre de troisième jet chargé d'impuretés (sucre roux), et la mélasse contenant 50% de son poids en sucre difficilement cristallisable. Les sucres de 2^{ème} et de 3^{ème} jet sont généralement refondus et intégrés en fabrication dans la liqueur standard. Le procédé s'arrête à ce stade car une quatrième extraction n'est économiquement pas rentable.

Grâce à une série de recyclages d'égouts pauvres et d'égouts riches, on épuise le sirop au maximum. Ce procédé conduit ainsi à la production de sucre de puretés légèrement différentes et à une mélasse, qui en outre sa richesse en sucre relativement élevée, contient toutes les impuretés. Le sucre cristallisé est séché à l'air chaud puis refroidi, il est ensuite classé, tamisé, pesé et dirigé vers l'ensachage ou le stockage.

La mélasse peut produire de l'alcool éthylique par fermentation et peut aussi servir à la fabrication d'aliments pour le bétail.

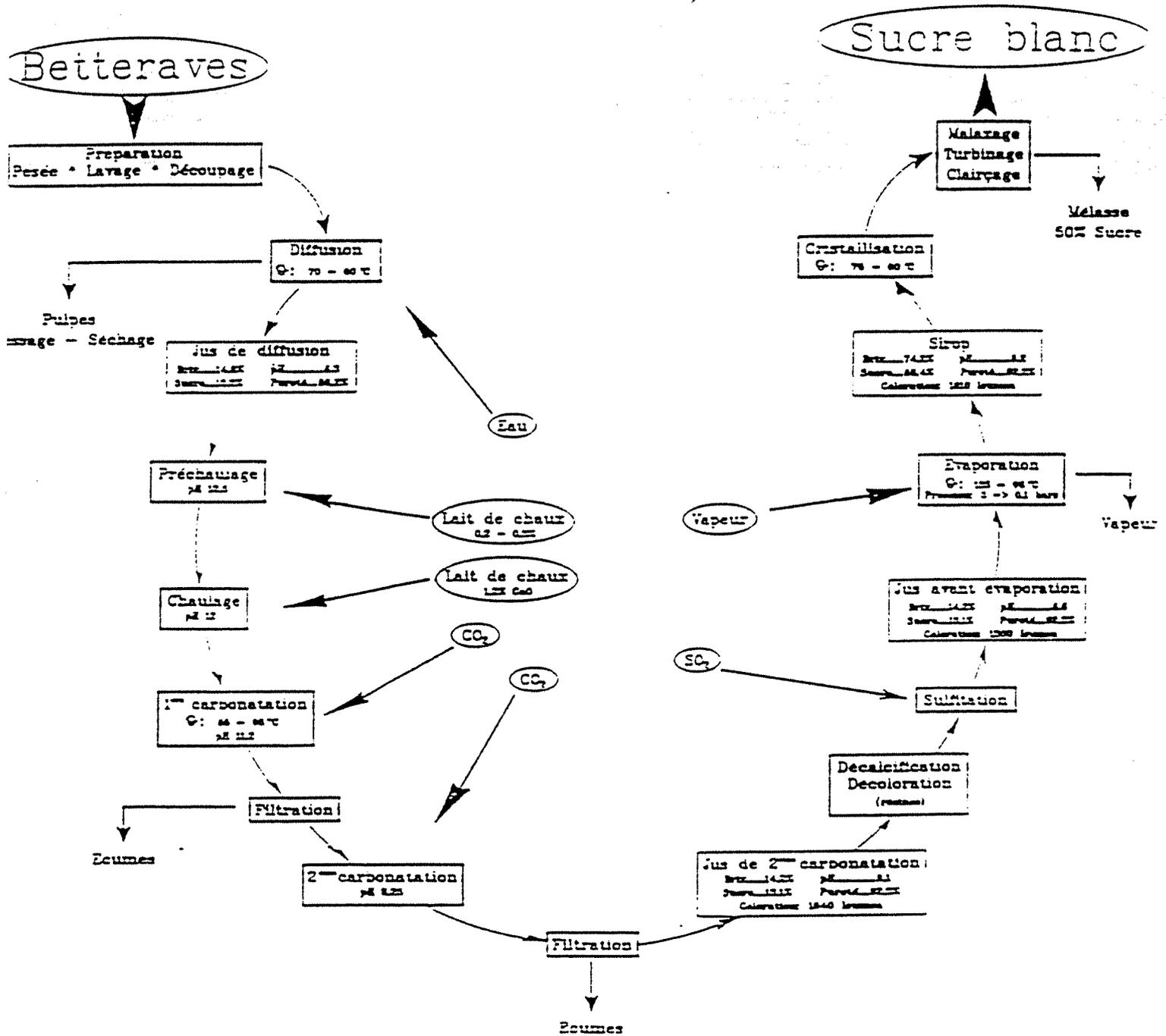


Figure 12: Schéma général de la fabrication (McGennis) (1982).

IV. Les non sucres contenus dans les jus et les sucres

L'extraction du saccharose à partir de la betterave sucrière génère un liquide avec beaucoup d'impuretés qui sont des matières organiques et des matières minérales. Ce liquide ou sirop est constitué de trois catégories de composants: l'eau 30%, le sucre 65% ainsi que toutes les impuretés appelées non sucres (NS) 5%.

Les NS comportent deux grandes familles de constituants:

- cendres ou matières minérales
- matières organiques qui contiennent les colorants.

Les matières colorantes sont un facteur important de la qualité du sucre, bien qu'elles ne soient pas pour autant la cause prépondérante des difficultés de cristallisation (Rousseau et col.)(1990). C'est ce qui a amené ces chercheurs à s'intéresser aux NS contenus dans les extraits sucrés, plutôt qu'aux impuretés retrouvées dans le sucre après cristallisation. Plusieurs chercheurs se sont intéressés auparavant à ces NS et ont essayé de les analyser et pour les caractériser. Ainsi (Roberts et col.)(1978) ont remarqué que tous les sucres contiennent des arabinogalactanes. Parfois on peut trouver aussi dans le sucre brut des dextrans qui sont des exopolysaccharides d'origine microbienne.

Shin (1985) a travaillé sur les sirops de canne et en a isolé par ultrafiltration un matériel composé en grande partie de polysaccharides, avec un faible pourcentage de protéines et de polyphénols. Après filtration sur membrane de coupure 10000 (PM10), il a mis en évidence six oses: le D glucose le plus abondant en même temps que arabinose, galactose, xylose, fructose et ribose. D'autre part (Roberts et col.)(1976) après avoir hydrolysé

des polysaccharides extraits des sirops de sucre ont identifié par chromatographie en phase gazeuse cinq oses: galactose, arabinose, glucose, mannose et xylose. On sait que l'arabinose et le galactose sont toujours associés aux pectines. Il a été toujours supposé que les pectines sont la source de ces sucres, cependant ces chercheurs n'ont pas trouvé d'acide galacturonique qui est le composé majeur des pectines. On peut aussi citer les travaux de (Copikova et col.)(1989) qui ont essayé d'identifier par chromatographie d'échange d'ions les oses isolés après hydrolyse acide des polysaccharides des produits sucriers issus de la betterave.

D'autres études effectuées par (Pathak et col.)(1988) ont souligné la présence d'arabinose et de galactose comme sucres prédominants dans la pectine extraite de la pulpe de betterave sucrière. Ils ont noté aussi la présence du glucose et du rhamnose en petites quantités.

(Wen et col.)(1988) se sont intéressés aux hemicelluloses et cellulose contenues dans les pulpes de betteraves. Après extraction ils ont trouvé que le poids moléculaire des hemicelluloses A est compris entre 40000 et 150000 par contre celui des hemicelluloses B est compris entre 10000 et 150000. Les sucres prédominants dans les hémicelluloses A sont le xylose, le mannose et le glucose quoique arabinose, galactose et rhamnose soient aussi présents. Dans les hémicelluloses B l'arabinose, le glucose et le galactose sont les sucres prédominants.

Le rapport arabinose/xylose dans les hémicelluloses B est plus important que dans le cas des hemicelluloses A. Ces auteurs (Wen et col.)(1988) ont trouvé que les hemicelluloses B manifestent une capacité élevée de rétention d'eau suivie par les hemicelluloses A et par la cellulose. La viscosité des hemicelluloses A et B est très basse et diminue légèrement par chauffage.

Les matières colorantes exercent des effets néfastes sur les

processus de fabrication, le rendement et la qualité du sucre produit. Les problèmes entraînés par ces matières colorantes ont stimulé les recherches sur les causes, les mécanismes et la prévention de leur formation.

L'apparition de la coloration dans le procédé de fabrication est due à la présence d'un certain nombre de substances dans le jus de diffusion. La première classification des substances colorées formées dans le milieu sucrier a été tentée par LUDEN en 1927. Vingt ans plus tard, ZERBAN (Madsen et col.)(1978) ont distingué trois familles:

- les complexes du fer avec les polyphénols

- les caramels, produits de décomposition des sucres

- les mélanoidines, produits de la réaction entre sucres réducteurs et composés aminés (produits de MAILLARD) (Maillard)(1916). A cette classification Tullin (1950) ajoute les mélanines issues de l'oxydation enzymatique de la tyrosine et de la DOPA. Des conclusions analogues ont été avancées par Kofodnielsen et col.)(1980) ont proposé 5 groupes de matières colorantes:

- 1- les mélanines: produits d'oxydation et de condensation de la 3,4 dihydroxyphenylalanine (DOPA).

- 2- les mélanoidines: produits des réactions de MAILLARD entre sucres réducteurs et composés aminés.

- 3- les produits de dégradation alcaline du saccharose

- 4- les colorants de type caramels dont les anhydrides sont formés par chauffage excessif du glucose, du saccharose ou du fructose

5- les complexes fer polyphenols entre fer et composés phénoliques tel que la DOPA.

La formation des pigments dans les solutions sucrées est un important problème pour la technologie et la chimie du sucre. C'est un domaine de recherche très difficile, bien que de nombreux travaux aient été consacrés à ce problème et publiés. Nombreux sont ceux qui ont mis l'accent sur la réaction de MAILLARD par exemple (Keramat et Nursten)(1990) (Margaret et col.)(1989) (Reinefeld et col.)(1982).

D'autres chercheurs se sont intéressés aux matières colorantes en utilisant plusieurs techniques; parmi eux une équipe britannique (Shore et col.)(1984) en utilisant la gel perméation à basse pression ont montré que les colorants qui ont un poids moléculaire inférieur à 5000 daltons sont très importants . Par ailleurs (Broughton et col.)(1986) en utilisant l'HPLC (gel permeation) ont montré l'existence d'un matériel de haut poids moléculaire d'environ 40000 daltons qui semble généré durant l'ébullition du sirop sucré. Ces auteurs pensent que ces produits proviennent de la polymérisation de petites molécules.

Il existe une controverse en ce qui concerne la contribution des polyphenols à la couleur du sucre blanc: le groupe DDS (De Danske Sukkerfabrikker) trouve une contribution significative au contraire British Sugar et le groupe de Braunschweig trouvent cette contribution de moindre importance (Reinefeld et col.)(1982) Cette controverse peut provenir des méthodes analytiques employées pour la détection des polyphenols (Winstrom-Olsen. et col.)(1986); la méthode HPLC exclue les polyphenols à partir d'un certain poids moléculaire. Cependant on peut penser qu'à température basse retenue pour le système de purification des jus de DDS l'élimination de ces colorants s'effectue moins bien qu'à haute température.

Les travaux de Maurandi (1988) en Italie ont montré la contribution de flavonoides à la coloration des sucres de betteraves. D'autre part Mantovani (1986) a mené une étude délicate et précise sur le mécanisme d'inclusion de la couleur dans le cristal de saccharose. Il a montré avec son équipe les différents mécanismes par lesquels les molécules de colorants cocrystallisent avec le saccharose dans le cas du sucre de betterave et dans le cas du sucre de canne (Mantovani)(1986) (Mantovani)(1985). Tout le monde est cependant d'accord avec l'existence de quantités relativement importantes de substances de haut poids moléculaires détectées dans le sucre, dans les sucres roux et les mélasses (sucre de betterave ou de canne). (Margaret et col.)(1989) (Mc Ginnis et Muller)(1984).

Nombreux sont les chercheurs qui ont essayé de trouver un remède à l'inhibition de la formation de la coloration en utilisant pour cela plusieurs techniques et plusieurs additifs. Ainsi (Vaccari et col.)(1987) ont trouvé que l'action décolorante du NaHSO_4 est plus importante que celle du Na_2SO_4 , d'autre part que NaHSO_4 n'accroît pas la teneur en mélasse. Avec le peroxyde d'hydrogène (Shrijadhav et col.)(1988) sont parvenus à des résultats encourageants pour l'amélioration de la couleur du sucre, leur explication est fondée sur le fait que le peroxyde d'hydrogène oxyde rapidement les intermédiaires des réactions enzymatiques en conduisant aux mélanines qui de ce fait peuvent être retirés au moment de la carbonatation.

L'utilisation pour la première fois (Mahfoud et Belcadi)(1990) des phosphates naturels à structure apatitique dans le traitement des jus de sucrerie a confirmé que ces solides présentent des propriétés adsorbantes qui peuvent éventuellement être exploitées pour fixer les substances colorées contenues dans les jus.

(Vanderpool et col.)(1987) ont remarqué que l'élimination de la couleur dans les centrifugeuses dépend de la quantité des eaux de lavage et de

la qualité du cristal. Ils ont étudié la quantité maximale des eaux de lavage de plusieurs fabrications, et ont trouvé une relation entre la couleur du sucre blanc et la couleur des masses cuites. Le rapport (couleur du sucre/couleur masse cuite) X100 est de l'ordre de 0,8% pour un cristal de bonne qualité.

Les procédés de décoloration des sirops ou de réfontes utilisent aussi les résines échangeuses d'ions, aussi bien en sucrerie qu'en raffinerie. Au début, elles étaient limitées à quelques applications, malheureusement les résines perdent rapidement leur efficacité de décoloration. Mais depuis quelques années, les fabricants de résines ont accompli un effort considérable pour mettre à la disposition de l'industrie sucrière une gamme de produits très étendue et dont la résistance est très nettement améliorée.

Plusieurs auteurs (Hervé)(1974) (Rousseau et Lancrenon)(1984) se sont intéressés aux résines échangeuses d'ions dans les procédés de décoloration et d'amélioration de la qualité de sucre. (Hervé)(1987) pense que cette utilisation des résines est surtout intéressante pour la production du sucre liquide. D'autres auteurs (Bento)(1990)(Ramm)(1988) se sont intéressés à la régénération de ces résines sachant bien que le problème majeur de leur emploi est une baisse rapide leur de capacité, qui se traduit par leur empoisonnement .

V. Interactions saccharose-eau-N.S. au cours de la cristallisation.

Le stade ultime de la fabrication est la cristallisation, celle-ci comporte deux étapes:

- la nucléation

- la croissance du cristal

L'élaboration du réseau cristallin dépend de la force des liaisons entre les molécules de saccharose. Cette force dépend de la concentration en saccharose dans la solution. Elle est réduite lorsque la teneur en saccharose est inférieure à 30%. Ainsi en évaporant l'eau du jus sucré on favorise la formation de liaison hydrogène entre les molécules de saccharose. La nucléation est amorcée en induisant le phénomène de saturation (par addition de semence) qui favorise la formation de liaisons intermoléculaires.(Figure13). La vitesse de cristallisation est une fonction de la sursaturation, de la température et de la pureté (Zdenek et Pavel)(1988)

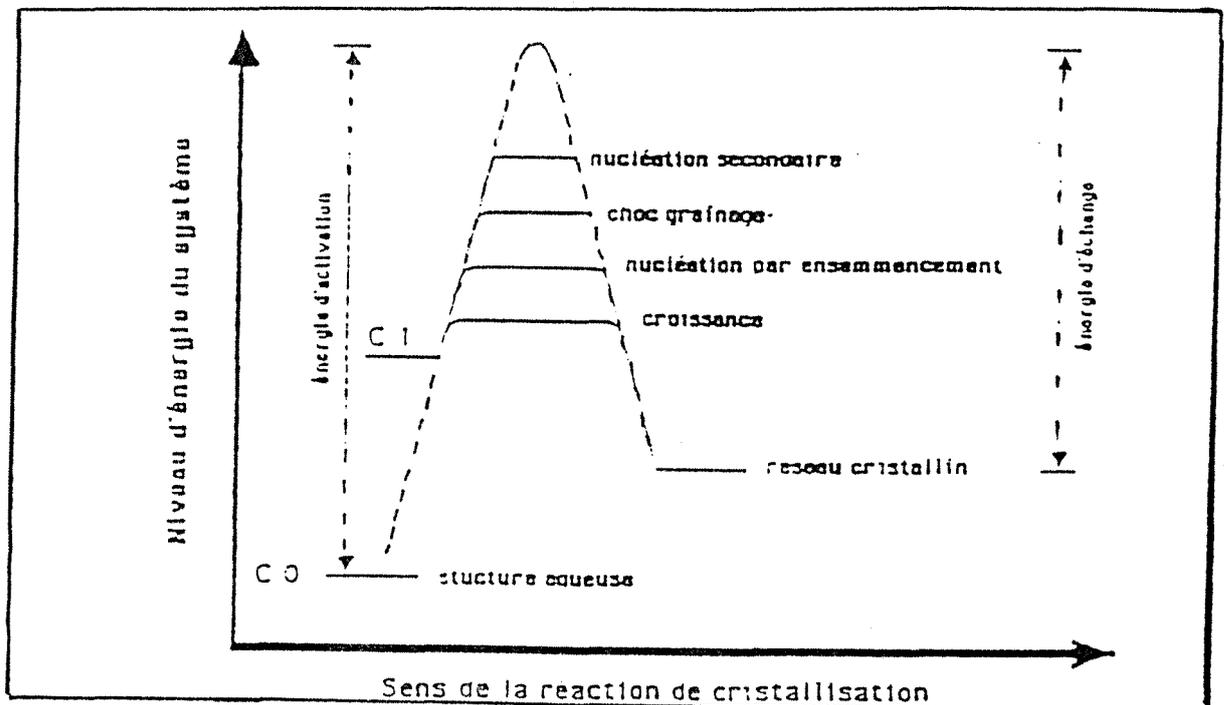


Figure 13: Diagramme d'énergie de la réaction de cristallisation

(McGinnis,)(1982).

La structure du cristal du saccharose est bien connue à partir des études de diffraction des rayons X. Cependant la structure de la solution de saccharose dans l'eau est controversée. Dans ce contexte de nombreuses publications suggèrent que le saccharose manifeste différentes

conformations en solution.

L'étude des mouvements dans les solutions de saccharose a utilisé la résonance magnétique nucléaire, les résultats de cette étude ont montré (McCain et Markley)(1986) que les conformations sont indépendantes de la température et de la concentration. Par contre (Mathlouthi)(1981) a travaillé sur l'état d'organisation des solutions de trois sucres: glucose, fructose et saccharose; il a trouvé que cet état est fonction de la concentration. Il a remarqué en plus que le saccharose présente une anomalie: il est le seul sucre qui établisse des liaisons intramoléculaire, le nombre de ces liaisons dépend aussi de la concentration.

Dans la même optique (Mathlouthi et col.)(1986) ont proposé pour la structure du saccharose trois possibilités en fonction de la concentration, ainsi on aura soit: 0, 1 ou 2 liaisons hydrogènes (Figure 14):

- la molécule de saccharose dans une solution aqueuse ne présente pas de liaisons hydrogènes à des concentrations inférieures à 22,3% (p/p). La formation des liaisons hydrogènes dans la solution défluée a lieu préférentiellement entre molécules d'eau dans les chaînes englobant des liaisons intermoléculaires (eau-sucre).(Figure 14 A)

- la première liaison hydrogène intramoléculaire est formée pour des concentrations comprises entre 22,3% et 65,3% (p/p) (Figure 14 B)

- quand la concentration augmente le rapprochement des molécules est accompagné d'un enroulement autour de la liaison glycosidique (C1 O C2') ceci conduit à la forme de la molécule de saccharose trouvée dans le cristal comportant deux liaisons hydrogènes intramoléculaires (Figure 14C)

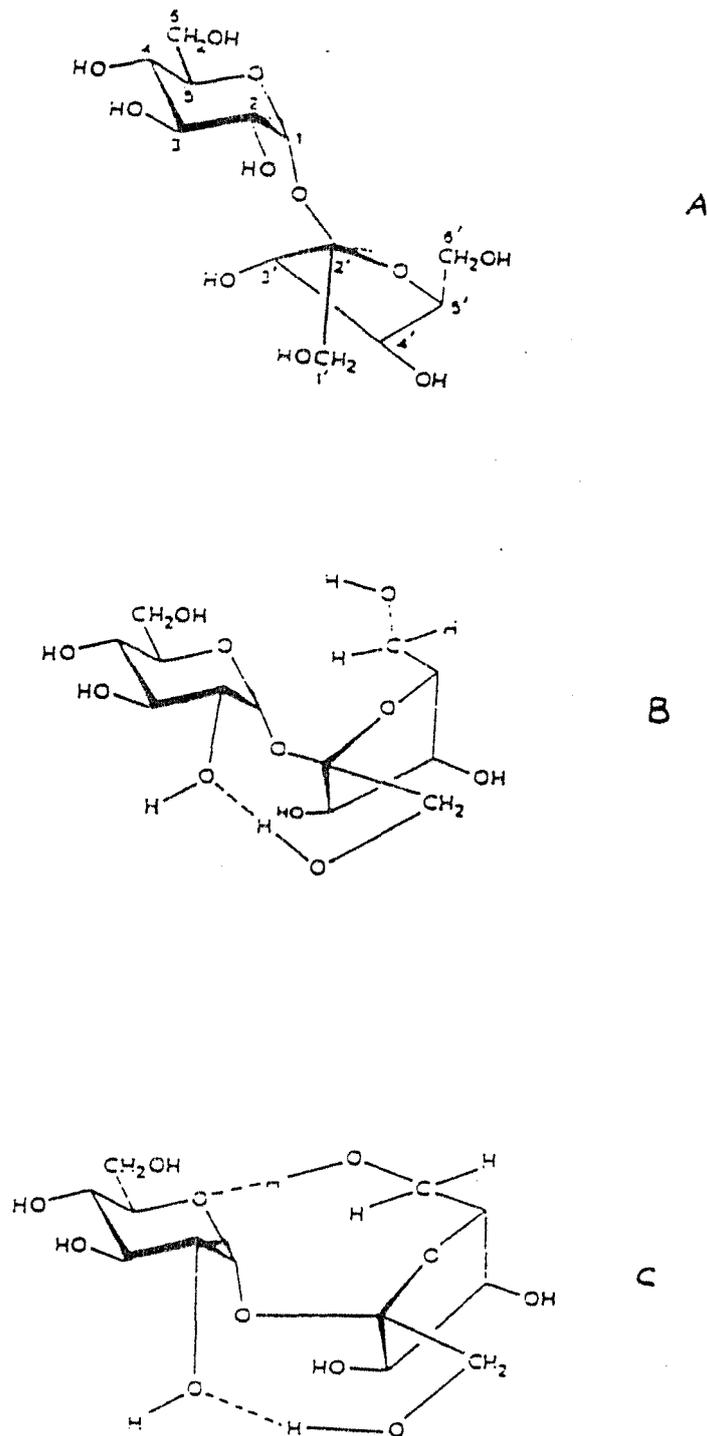


Figure 14: Structure de la molécule de saccharose en solution aqueuse en fonction de la concentration d'après (Mathlouthi et col).(1986)

Ces trois formes possibles de saccharose dans les solutions aqueuses tendent à confirmer la flexibilité notable de la molécule. Ces résultats confirment ceux déjà trouvés par (Allen et col.)(1974) qui ont

suggéré que sur les huit groupements hydroxyles que contient la molécule de saccharose, trois de ces groupements et un atome d'oxygène participent à la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires, dans l'état solide, notamment OH(1')-OH(2) et OH(6')-O(5), les cinq groupements hydroxyles restant sont impliqués dans des liaisons hydrogènes intermoléculaires pour la formation du cristal du saccharose.

Vanhook (1987) a exposé la théorie de la cristallisation du saccharose, il a notamment mis l'accent sur la nécessité d'élargir les données expérimentales au delà du domaine de la saturation; et a en plus discuté l'influence de la température et des impuretés, ainsi que de l'état d'hydratation du saccharose en solution aqueuse.

Une étude récente par spectroscopie R.M.N.(Richardson et col.)(1987) des solutions de saccharose de concentration comprise entre 5 et 80% (p/p), ont mis en évidence des changements qui se produisent dans la mobilité relative des molécules de saccharose. La spectroscopie de R.M.N. permet de suivre les vitesses de relaxation des molécules d'eau dans les solutions de saccharose, cette vitesse dépend directement de la mobilité des molécules d'eau en solution, (Hartel et Shastry)(1991).

En dépit de ces tentatives d'approfondissement des structures (Mathlouthi)(1981) (Mathlouti et col.)(1986) (Franks et col.)(1973), il subsiste toujours une ambiguïté au sujet la nature exacte des interactions moléculaires dans les solutions sucrées. Pour les concentrations élevées en particulier, les interactions entre molécules de saccharose responsables de la nucléation demeurent mal connus.

En résumé, on observe l'accroissement des interactions moléculaires lorsque la concentration en sucre dans la solution augmente. Cependant la nature exacte de ces interactions n'est pas encore définie clairement. En plus la relation entre les interactions moléculaires et la

cristallisation du sucre (particulièrement en terme de formation de nucléi) n'a pas encore été étudiée d'une façon suffisamment approfondie.

L'étude de la nucléation de contact et de la vitesse de croissance du cristal de saccharose a attiré l'attention de (Liang et col.)(1987) qui ont confirmé et expliqué les données sur la nucléation de contact du saccharose présentées par (Shanks et Berglund)(1985). Ces auteurs ont montré que les nuclei de saccharose dès qu'ils sont formés donnent lieu à une distribution initiale de tailles. Les vitesses de croissance de ces nuclei donnent lieu à une grande dispersion: des cristaux différents croissent à des vitesses différentes (Schliephake et col.)(1987), cependant chaque cristal pris individuellement croît à vitesse constante.

La présence d'impuretés modifie les conditions d'équilibre de la solution, en particulier la solubilité à concentration donnée peut être dramatiquement changée; l'existence de macromolécules dans la solution de saccharose comme par exemple protéines, amidon, pectines, etc..., entraînent généralement une diminution de la saturation de la solution de saccharose. Ces faites changent aussi la solubilité du saccharose, ce changement est en relation avec les interactions moléculaires entre le soluté et l'eau (Hartel et Shastry)(1991). Les impuretés peuvent agir en tant qu'obstacles mécaniques gênant les molécules d'eau et les molécules de saccharose dans leurs libre mouvements et par conséquent ralentissent la vitesse de cristallisation. (Saska et Oubrahim)(1989). Les macromolécules exercent donc un effet significatif sur le transfert de masse du saccharose au travers de la solution. L'incorporation de ces molécules dans le sirop de saccharose réduit effectivement la nucléation (Saska)(1988). Ainsi le raffinose impureté naturelle présente dans le sucre de betterave joue un rôle important dans sa cristallisation. Récemment (Liang et col.)(1988) ont étudié l'effet du raffinose sur la cristallisation du saccharose; dans cette étude, ces auteurs ont essayé de faire varier la concentration en raffinose en même temps que

la température; ils ont remarqué que la solubilité du saccharose diminue lorsque la concentration en raffinose augmente et que la température diminue.

L'action de ces polysides sur la viscosité et peut être même sur la formation des cristaux a fait l'objet de nombreuses hypothèses:

- il y a probablement interaction entre N.S./eau-sucre qui a pour effet de modifier l'activité du sucre en solution. Les N.S. ajoutés en s'hydratant doivent contribuer à accroître la concentration du saccharose dans l'eau, et par conséquent la viscosité des solutions autour des cristaux.

- pour certains auteurs les N.S. peuvent aussi réagir avec le sucre dissout pour former par exemple des "saccharates"; dans ce cas la concentration en sucre diminue et la solution peut éventuellement dissoudre plus de sucre "libre".

- il y a également interaction entre les N.S. en solution et le saccharose cristallisé. Certains N.S. peuvent être adsorbés, ou accumulés à la surface ou au sein des cristaux de sucre pendant leur croissance. Lorsqu'ils s'accumulent sur les faces, ils inhibent la croissance.

D'autres auteurs se sont penchés sur la détermination de la teneur en eau des solutions de saccharose (Brosio et col.)(1978) (Guillou-Charpin et col.)(1990) et sur l'étude de l'état physique de l'eau dans différents produits alimentaires (Leboltan et Nicolaidis)(1989)(Brosio et col.)(1983). De plus la mobilité de l'eau dans les solutions de saccharose a été étudié par différentes techniques physiques et physico-chimiques. Le mécanisme de fixation de l'eau a fait l'objet de considérations diverses en conformité avec la nature des produits examinés:

- les propriétés thermodynamiques en relation avec l'activité de l'eau, la quantité d'eau qui reste après séchage, ou qui n'est pas

transformée en glace à basse température.

- les propriétés dynamiques quand on étudie la diffusion, la viscosité, la sédimentation ou même les vitesses de relaxation des H^+ .

- les propriétés structurales quand on se penche sur la distribution et l'orientation des molécules (Rayons X., Infra-Rouge).

(Liang et Steinberg)(1981) ont montré que les valeurs de l'activité de l'eau (a_w) varient entre 0,863 et 0,95 ce qui correspond à un rapport saccharose/eau compris entre 2,03 et 0,96 (p/p). La quantité d'eau dans la solution m peut être simplement exprimée en fonction de (a_w) par la relation ($m=(a+b) \log(1-a_w)$). (Richardson et col.) (1987) ont étudié la mobilité de l'eau associée au saccharose pour des concentrations comprises entre 5 et 80%, ce qui leur a permis de déterminer trois zones dans lesquelles la mobilité de l'eau diminue avec l'augmentation de la concentration de l'eau. Ils ont attribué aux liaisons hydrogènes la réduction de la mobilité de l'eau observée pour des concentration supérieures à 40% en saccharose. (Belton et Wright) (1986) ont conclu que leurs résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle en solution aqueuse chaque molécule de saccharose modifie la mobilité de 16 molécules d'eau. Lebolton et col. (1988) ont utilisé différence entre les temps de relaxation de différents protons dans la molécule de saccharose et l'eau pour déterminer par R.M.N. à basse résolution la teneur en eau dans les solutions de saccharose dans un domaine de concentrations à partir de 33 jusqu'à 43% de saccharose. Enfin signalons que Lebolton et col.(1988). Vaccari et col. (1990) ont effectué des tests interlaboratoires pour la détermination de l'humidité dans les sucres bruts de betteraves et de cannes, la teneur en humidité étant de l'ordre de 0,05 jusqu'à 1,5%. Le taux d'humidité du sucre de betterave est très élevé par rapport à celui du sucre de canne (canne: entre 0,05 et 0,54, betterave entre 0,4 et 1,57).

BUT DU TRAVAIL

Afin de mieux comprendre l'origine des problèmes rencontrés lors de la cristallisation du saccharose extrait des jus de betteraves sucrières, et qui entraînent une diminution de la qualité du sucre, nous nous sommes plus particulièrement attachés à une étude comparative de la composition de divers échantillons industriels en provenance de plusieurs usines de la CEE.

Nous avons consacré le premier chapitre de ce travail au fractionnement chromatographique d'échantillons de différentes origines. Ainsi notre réflexion a été guidée par le comportement des résines industrielles (dites de "Nouvelle déminéralisation") qui permettent d'améliorer nettement la qualité des sucres produits, mais dont la composante anionique s'empoisonne au fur et à mesure de l'utilisation. De plus l'observation au microscope électronique de la résine montre un véritable feutrage superficiel qui semble expliquer la perte de la capacité d'échange.

D'où l'intérêt pour la détermination de la nature des substances responsables de cet empoisonnement.

Dans un premier chapitre nous nous sommes donc intéressé à la caractérisation chromatographique (échange d'ions, exclusion stérique) des fractions macromoléculaires isolées par ultrafiltration ou dialyse de différents échantillons de "produits sucrés" (sirops, EP2 et sucre roux) provenant de différentes usines de la CEE.

Dans un deuxième chapitre, notre travail a porté sur l'étude de la compétition des différents constituants hydrophiles en solution (saccharose, polyosides) pour l'eau lorsqu'on modifie cet équilibre par addition d'alcool éthylique au milieu. L'éthanol très hydrophile provoque une floculation des substances les plus hydrophobes que l'on peut suivre par néphélométrie. Nous avons de plus étudié l'influence du Brix et du pH sur ce "test à l'alcool" qui nous a permis de réaliser des comparaisons entre différents échantillons, comparaison qui devrait nous aider à comprendre les interactions complexes en particulier entre saccharose et macromolécules.

Dans la deuxième partie du travail nous nous sommes intéressés aux pulpes, résidu obtenu après extraction du sucre de la betterave. Nous avons étudié l'incidence de l'hydrolyse alcaline de ces pulpes. Afin de voir si les polyosides des pulpes qui peuvent ainsi entrer dans le processus peuvent être à l'origine des macromolécules présentes dans les différents jus

Enfin nous avons consacré une étude à la valorisation des pulpes sous forme de fibres alimentaires en tant que fibres naturelles. De là nous avons essayé de proposer des solutions pour résoudre le problème du blanchissement et du rancissement que rencontrent ces pulpes, puis pour terminer nous étudierons les principales propriétés physico-chimiques du produit obtenu.

MATERIEL & METHODES

I. Matériel d'étude

Les échantillons industriels (produits sucrés et pulpes de betterave) sur lesquels nous avons travaillé ont été fournis par la Générale Sucrière. Il s'agit d'échantillons issus de différentes usines: France (Epeville), Danemark (Nakskov, Assens et Saxkopig) et RFA (Appeldorn). Les travaux ont porté plus spécialement pour les produits sucrés sur les sirops, les EP2 et les sucres roux; pour les pulpes nous avons travaillé soit sur des pulpes fraîches soit sur des pulpes sèches industriellement.

II. Fractionnement des échantillons

II.1. Ultrafiltration

100 g d'échantillon sont dilués de moitié à l'aide d'eau distillée puis ultrafiltrés successivement (Figure 15) sur deux membranes de point de coupure différent:

- PM10: membrane de point de coupure 10000 daltons retenant les substances de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons
- YM2: membrane de point de coupure 2000 retenant les substances de poids moléculaire supérieur à 2000 daltons.

Nous avons opéré sous flux d'azote et sous agitation magnétique à 4°C. L'ultrafiltration est opérée en ajoutant 150 ml d'eau à l'échantillon; ainsi nous éliminons la quasi totalité du saccharose de l'afiltrat. Nous avons ultrafiltré 100 g d'échantillon d'abord sur PM10 pour récupérer d'une part l'afiltrat (fraction de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons) et d'autre part le filtrat, ce dernier est ensuite ultrafiltré sur membrane YM2, pour

conduire d'une part à une fraction de poids moléculaire inférieur à 2000 daltons et d'autre part à une fraction de poids moléculaire compris entre 10000 et 2000 daltons.

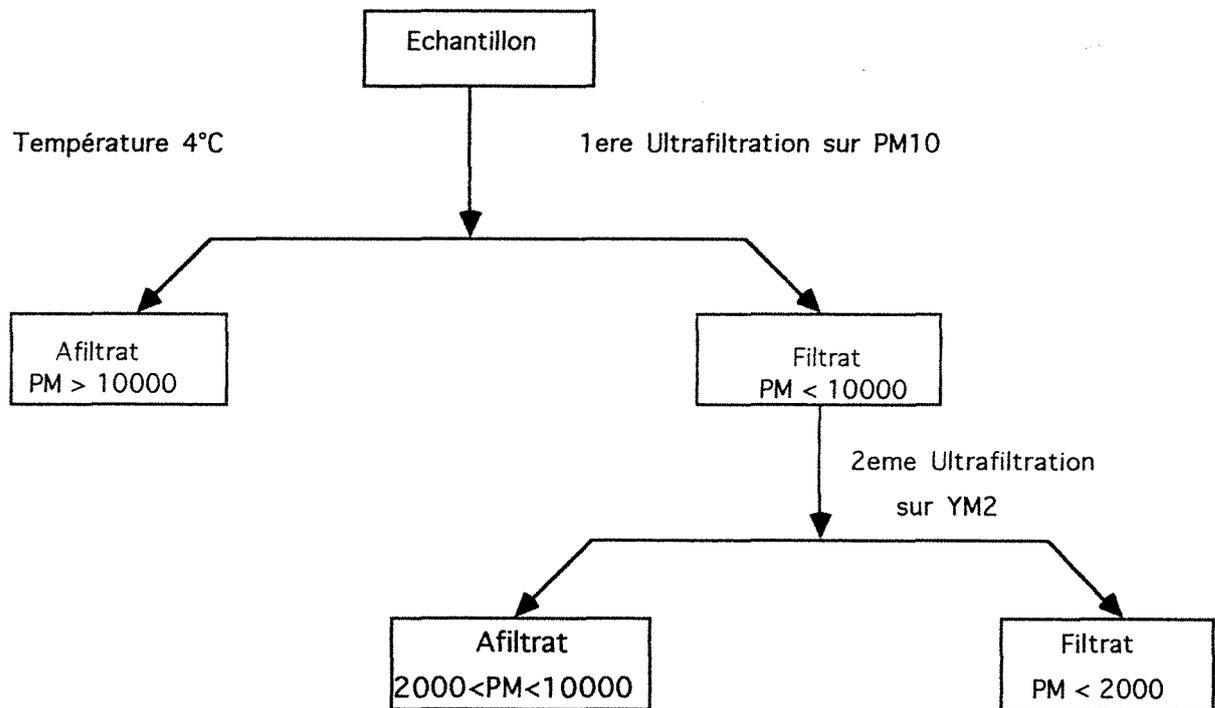


Figure 15: Schéma d'ultrafiltration

II. 2. Dialyse

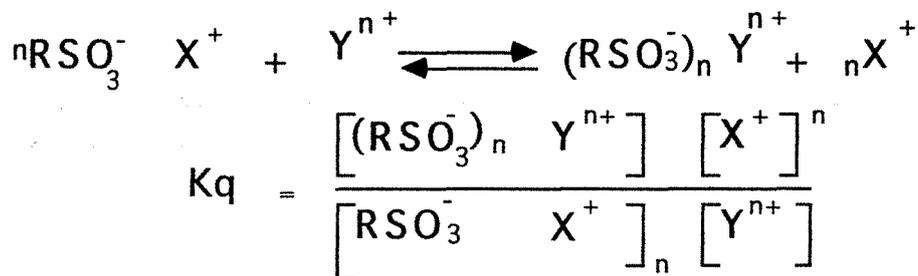
On remplit un boudin à dialyse de 15 cm de long sur 5 cm de diamètre (membrane en cellulose régénérée de point de coupure 8000 daltons) avec l'échantillon à dialyser. Après maintien pendant quatre jours à une température de 4°C sous l'eau du robinet renouvelée en continu on immerge finalement le boudin pendant 24 heures dans un grand bêcher (5 litres) rempli d'eau distillée que l'on renouvelle deux fois. Nous avons pris soin d'ajouter de l'oxytétracycline (100mg/l) (antibiotique inhibant la croissance des bactéries) et de l'actidione (20mg/l) (inhibant le développement des levures).

Après cinq jours de dialyse on recueille l'adialysat qui se présente sous forme d'un flocculat plus ou moins dense. L'adialysat est ensuite soumis à une centrifugation (14000 g) pendant 15 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée BECKMAN J2-21. Nous obtenons dans ces conditions un culot et un surnageant qui sont congelés dans un mélange de glace carbonique et d'acétone avant lyophilisation à l'aide d'un lyophilisateur LEYBOLD HERAEUS. Dans ces conditions le produit obtenu conserve ses propriétés de solubilité dans l'eau.

III. Fractionnement chromatographique

III.1. Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions est une technique utilisée pour la séparation des espèces dissociées, porteuses de charges électriques et pour lesquelles la rétention est fonction de l'état d'ionisation, c'est à dire de la valeur des pK. Dans le cas d'un échangeur de cations à groupements sulfonates, fixés sur une matrice polymère R. On peut illustrer le mécanisme d'échange suivant le schéma:



Kq = constante d'équilibre, d'échange ou de sélectivité

X = cation de compensation

Y = échantillon chargé porteur de n charges

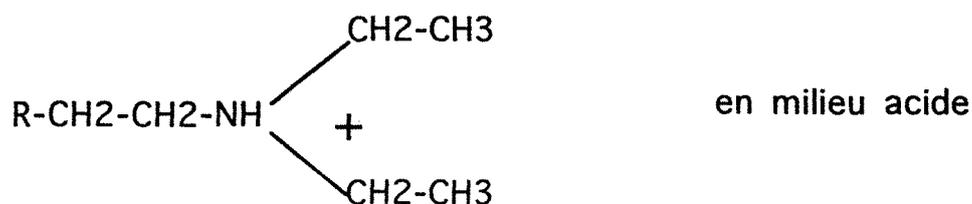
$n\text{RSO}_3^-$ = matrice chargée

$(\text{RSO}_3^-)_n \text{Y}^{n+}$ = matrice neutralisée

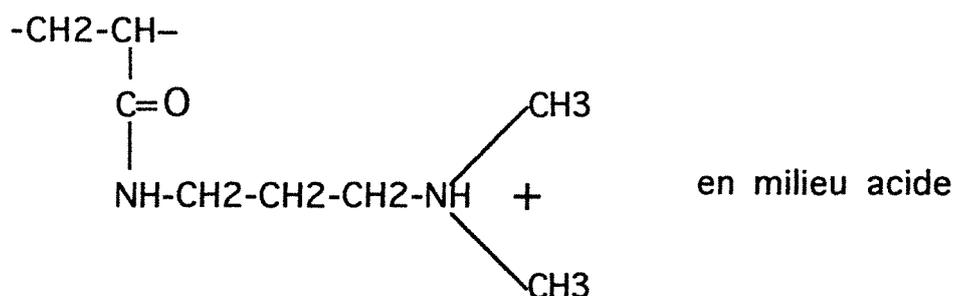
$n\text{X}^+$ = cation de compensation libérés

Dans notre travail nous avons utilisé deux résines échangeuses d'anions le DEAE Sepharose CL 6B et l'Amberlite IRA 35S:

DEAE Sépharose CL 6B



Amberlite IRA 35 S



Dans un premier temps une colonne (1,6 cm de diamètre sur 12 cm de long) est remplie de DEAE Sepharose CL 6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala., Suede) d'une capacité d'échange de 15 plus ou moins 1 meq par 100 ml ce qui correspond à 0,6 meq par gramme de résine sèche. Les particules de cette résine ont une dimension comprise entre 45 et 160 μm , cette résine est équilibrée par le passage de 200 ml d'un tampon phosphate 0,05M pH 4,8.

Après le dépôt de l'échantillon (sirop, EP2), la fraction polysaccharidique non chargée à pH 4,8 est éluée avec le même tampon

phosphate 0,05M pH 4,8, tandis que les fractions polysaccharidiques chargées(-) sont retenues. Les fractions chargées sont éluées en augmentant progressivement la force ionique de l'éluant; pour cela la solution de tampon phosphate 0,05M pH 4,8 est additionnée de NaCl pour obtenir successivement une concentration de 0,5, 1, et 2M en NaCl. La séparation chromatographique est contrôlée par une pompe péristaltique dont le débit est réglé à 20 ml par heure, nous recueillons dans ces conditions des fractions de 15 ml par tube. Nous avons utilisé un collecteur de fraction ISCO modèle L328 de 190 tubes de capacité; équipé d'un détecteur spectrophotométrique calé sur 280 nm et d'un enregistreur tous de marque ISCO. La résine Sepharose CL 6B est régénérée par drainage de la colonne à l'aide d'une solution tampon phosphate 0,05M pH 4,8 contenant NaCl 2M; on revient ensuite aux conditions initiales par passage de tampon phosphate 0,05M pH 4,8.

La même colonne (1,6 cm - 12 cm) est remplie de résine Amberlite IRA 35S D'une capacité d'échange de 5,3 meq par gramme (sec); sa granulométrie est comprise entre 100 et 200 μm , la manipulation est conduite dans les même conditions que pour la résine Sepharose CL 6B

III.2. Chromatographie d'exclusion stérique

Dans certains cas pour éviter d'avoir à dialyser ou à ultrafiltrer nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion stérique avec un gel de bas point de coupure permettant ainsi de séparer les petites molécules (et en particulier le saccharose), des molécules de poids moléculaire plus élevé. La chromatographie d'exclusion permet de repérer la présence de composés de poids moléculaire élevé.

La chromatographie d'exclusion est basée sur la rétention sélective des molécules de soluté en fonction de leur taille, et de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Une colonne de 45 cm sur 1,6 cm de diamètre interne est remplie de gel Trisacryl GF 05 (IBF). Les échantillons (sirop EP₂ et sucre roux) déposés sur la colonne sont élués à l'eau distillée. Le débit de la phase mobile est contrôlé par une pompe péristaltique, les fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions équipé d'un absorptiomètre UV ($\lambda_{\text{max}}=280\text{nm}$) et d'un enregistreur (la réponse du détecteur spectrophotométrique à 280 nm a été comparée à celle d'un réfractomètre différentiel pour s'assurer de la validité de la méthode et du choix d'un λ_{max} de 280 nm)

Nous avons partagé l'éluat en deux fractions:

- la fraction F₁, exclue du gel, (de poids moléculaire supérieure à 3000 daltons) contient essentiellement des constituants macromoléculaires, dont une partie des substances colorées
- la fraction F₂ est incolore en solution et blanche après lyophilisation, elle contient essentiellement du saccharose et des sels minéraux. (La présence du saccharose a été vérifiée par chromatographie sur couche mince)

IV. Isolement des pigment sur Sep Pak C18

Le fractionnement et l'isolement de la fraction colorée contenant les "pigments" bruns a été opéré sur cartouche de silice greffée octadécyle Sep-Pak C18 (Waters) préalablement percolée à l'aide de méthanol pur. Les échantillons à fractionner sont dilués de moitié puis amenés à pH 7 à l'aide d'HCl 1N. Le mélange est alors passé sur la cartouche, qui est ensuite rincée à l'eau distillée pour en éliminer tout le saccharose. Les pigments retenus sont en suite élués à l'aide d'un mélange éthanol/eau 5:3 (v/v puis

sont lyophilisés après élimination de l'éthanol par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif.

V. Chromatographie en phase gazeuse des sucres

V.1. Conditions opératoires

L'appareil utilisé est de marque Packard 5750G équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Colonne en verre garnie d'OV1 à 1% sur Chromosorb W/AW 80- 100 mesh, longueur 4 m

Conditions opératoires:

- température du détecteur 250°C
- température de l'injecteur 250°C
- programmation de la température du four, à raison de 2°C par minute de 110 à 200°C avec maintien de la température à 200°C pendant 5 minutes. Le débit d'azote est de 20 ml par minute

V.2. Hydrolyse

50 à 100 mg de résidu polysaccharidique sont introduits dans un tube à vis de 25 ml, après addition de 1,6 ml d'acide trifluoroacétique anhydre, les tubes sont hermétiquement fermés et abandonnés à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec 0,4 ml d'eau distillée pour ramener la concentration de l'acide à 80%; puis les tubes sont maintenus à l'étuve à 110°C pendant 2 heures. Après refroidissement, les tubes sont évaporés sous pression réduite pour éliminer l'acide Trifluoroacétique et le résidu est repris dans un minimum d'eau distillée puis filtré sur cartouche Sep Pak pour fixer les pigments bruns

formés lors de l'hydrolyse. Les filtrats sont évaporés à sec puis maintenus au dessiccateur pendant une nuit en présence de P_2O_5

V.3. Silylation et analyse

La méthode de silylation a été expérimentée par GOODENOUGH et coll(1982). Pour silyler les échantillons d'oses nous introduisons dans un tube à vis (10 cm de long sur 1 cm de diamètre):

- 1 ml de pyridine
- 0.2 ml de HMDS (Hexamethyldisilazane)
- 0,1 ml de TMCS (Triméthylchlorosilane)

Puis on laisse réagir à température ambiante pendant 4 heures. Les échantillons sont analysés dans les conditions reportées ci dessus

VI. Dosage des sucres totaux (Méthode phénol sulfurique)(DUBOIS 1956)

Les oses et leurs dérivés méthylés réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré pour donner un produit de coloration jaune orangée stable pendant plusieurs heures, le maximum d'absorption se situe à 490 nm pour les hexoses et à 480 nm pour les pentoses; le procédé utilisé est le suivant:

A 1 ml d'échantillon en milieu aqueux contenant de 10 à 70 μg de sucre, on ajoute 1 ml de solution de phénol à 5% (v/v) fraîchement préparée puis on agite pour bien mélanger, l'essai à blanc est préparé de la même manière avec 1 ml de tampon phosphate à la place de la solution d'échantillon, on ajoute rapidement à chaque tube 5,0 ml de H_2SO_4 concentré,

on agite le mélange réactionnel puis on bouche les tubes. Au bout de 10 minutes ils sont agités de nouveau avant d'être placés dans un bain marie dont la température est réglée à 30°C pendant 30 minutes. Le produit coloré formé est stable pendant plusieurs heures, les dosages sont facilement reproductibles et la précision de la méthode est de l'ordre de 3%. Elle présente cependant l'inconvénient de ne pas être spécifique du glucose, elle permet de doser en fait de nombreux oligosides, polyosides ainsi qu'un certain nombre de leur dérivés

VII. Détermination du pouvoir réducteur

La recherche du pouvoir réducteur d'une substance ou d'une solution revient en fait à une réaction d'oxydo-réduction entre la ou les substances réductrices du milieu étudié et un réactif le $K_3Fe(CN)_6$ (Potassium hexacyanoferrate III ou Potassium ferricyanure). 1 à 3 ml de solution contenant 1 à 9 mg de sucre sont mélangés avec 1 ml de réactif contenant 0,53% (p/v) de carbonate de Na et 0,065% (P/V) de KCN, ainsi que 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ à 0,05% (p/v). Le mélange est chauffé 15 min dans un bain marie bouillant puis après refroidissement on ajoute 5 ml d'une solution contenant 1,5 g de sulfate ferrique ammoniacal (Alun de fer) et 1 g de détergent (Dupanol: Triton X100 ou SDS) dissous dans 1000 ml de H_2SO_4 0,05N. Une couleur bleue stable apparaît dont le λ max est de 700 nm

VIII. Détermination des acides uroniques par la méthode au méta-hydroxy-diphényl (MHDP).

On détermine la quantité totale d'acides uroniques sur les filtrats. Ces acides sont obtenus au préalable par hydrolyse en milieu acide sulfurique et à chaud.

VIII.1. Hydrolyse

VIII.1.1. réactifs.

- acide sulfurique à 72%.

VIII.1.2. mode opératoire.

On pèse une quantité précise (10 mg) de filtrat que l'on place dans un tube à vis à joint téflon. On y ajoute 0,5 ml d'acide sulfurique à 72%. Le mélange obtenu est laissé pendant 1 heure au bain-marie à 40°C. Puis, on dilue ce mélange avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 6,5 ml. On agite et on place la solution pendant 2 heures à 100°C. On filtre en utilisant du coton de verre afin de limiter au maximum les pertes. On obtient ainsi une solution parfaitement limpide qui sera utilisée pour le dosage.

VIII.2. Dosage de des acides uroniques par la méthode au MHDP.

Cette méthode a été mise au point par Blumenkrantz et Asboe Hansen (1973), a été modifiée par Kinter et Van Buren (1982). L'acide libéré lors de l'hydrolyse des filtrats est déterminé par la formation d'un produit de réaction coloré en rose en présence de MHDP, dont le maximum d'absorption se situe à 520 nm.

VIII. 2.1. réactifs

- m-hydroxydiphényle (MHDP) à 0,15% (p/v) en solution dans NaOH 0,5% (p/v)-MHDP.

- solution de tétraborate de sodium 0,0125 M dans l'acide sulfurique concentré.

- solution d'acide galacturonique à 100 mg/l

VIII.2.2. mode opératoire.

La courbe d'étalonnage pour ce dosage s'étend dans des gammes de concentrations comprises entre 0 et 100 mg/l. A 0,2 ml d'échantillon préalablement dilué et refroidi dans la glace, on y ajoute 1,2 ml de la solution de tétraborate de sodium- H_2SO_4 . Ce qui permet à la réaction de débiter en même temps dans tous les tubes.

Les tubes sont agités au vortex puis placés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes. Ils sont ensuite refroidis à température ambiante avant d'ajouter 0,020 ml de méta-hydroxy-diphényl à 0,15 % dans NaOH 0,5%. On agite les tubes au vortex et au bout de 5 minutes on lit l'absorption à 520 nm.

Il est nécessaire de réaliser pour chaque essai un témoin ou l'on remplace les 0,020 ml de MHDP par 0,020 ml de soude 0,5%. Ces témoins sont traités dans les mêmes conditions que les essais.

La figure 16 nous présente la courbe d'étalonnage.

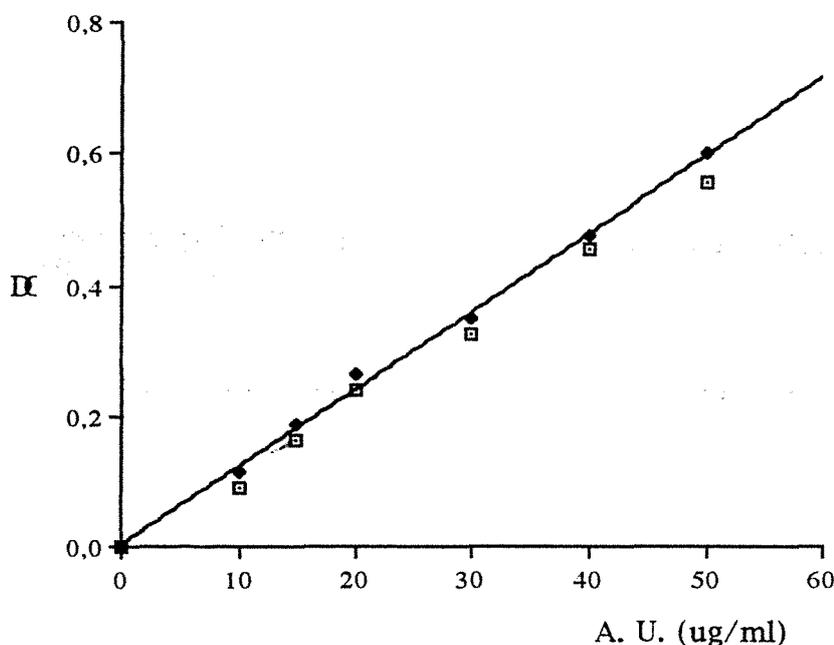


Figure 16: Courbe étalon effectuée pour le dosage des acides uroniques par la méthode au MHDP

IX. Détermination de la teneur en matières sèches dans les sirops de sucre

L'expression d'une concentration, telle que celle des matières sèches (MS) dans une solution sucrée, s'effectue en Brix; ainsi une solution contenant 75,5% de matières sèches présente une concentration de 75,5 Brix.

La détermination de la matière sèche d'un sirop de sucre ne peut pas se faire par simple étuvage, en effet la très forte concentration en sucre entraîne la rétention d'une grande quantité d'eau dans l'échantillon. De plus lors du passage à l'étuve même si la température n'est pas trop élevée (50-60°C) entraîne la formation d'une véritable croûte qui empêche l'élimination de l'eau. Ainsi la détermination du Brix est opérée de deux manières différentes:

1- l'utilisation de l'indice de réfraction permet de déterminer aisément la teneur en matière sèche, assimilée aux sucres toutefois cette méthode nous a paru moins rigoureuse que la méthode pondérale 2.

2- le Brix est donc calculé de la façon suivante: on découpe des bandelettes rectangulaires de papier Whatman N° 1 de dimensions 0,5 sur 4 cm, puis on les dispose dans des creusets en porcelaine, l'ensemble est maintenu dans une étuve à 60°C, pendant 5 heures puis après on en détermine le poids vide. Parallèlement, on pèse exactement 2 g d'échantillon dans une fiole jaugée de 10 ml qu'on complète avec de l'eau distillée. Ensuite on prélève 4,0 ml de la solution sucrée diluée qu'on verse uniformément sur toutes les bandelettes disposées dans le creuset, l'ensemble est réintroduit dans la même étuve à 60°C. Durant une nuit. Les creusets sont ensuite retirés et refroidis avant d'être pesés, la différence entre le poids des creusets vides + bandelettes et celui indiqué par la dernière pesée permet de calculer le Brix de l'échantillon étudié. (Il faut tenir compte dans le calcul de

la dilution effectuée). Les résultats exprimés sont la moyenne de 3 déterminations pour chaque échantillon.

X. Mesure du trouble: néphélémétrie

La mesure du trouble consiste à quantifier l'intensité de la lumière diffusée par l'ensemble des particules contenues dans un volume de suspension donné. Le trouble est formé en rajoutant aux solutions sucrées de l'éthanol à 95%. La turbidité mesurée au néphélémètre est exprimée en unités arbitraires.

Les solutions de sucre de Brix donné et l'éthanol à 95% (v/v) sont maintenues à 0°C dans un bain de glace fondante pendant 15 minutes. On introduit 10 ml de la solution sucrée de Brix donné sous agitation magnétique dans un bêcher maintenu à 0°C (un bain de glace) dans lequel on verse 2,5 ml d'éthanol. On attend 1 minute puis on prélève 5,0 ml du mélange que l'on introduit dans la cellule du néphélémètre, on note la valeur de l'intensité de la lumière diffusée, on vide le contenu de la cellule dans le bêcher, puis on ajoute à nouveau 2,5 ml d'éthanol et ainsi de suite. Il est indispensable de procéder à un rinçage très soigneux de la cellule pour procéder à l'essai suivant à fin de ne pas comptabiliser de manière aberrante la turbidité imputable aux salissures. Pour chaque essai, les solutions sucrées sont ramenées à un Brix défini soit 20, 30 ou 40 Brix (en saccharose) à l'aide d'un tampon phosphate 0,25M de pH 4,8. Le pH de la solution finale est ajustée à 6,5 ou 3,5 à l'aide d'acide chlorhydrique 1N.

XI. Isolement des macromolécules par précipitation à l'alcool

Cet isolement consiste en un relargage des macromolécules par déstabilisation des solutions à l'aide d'alcool à différents pH.

Les EP2 des différents sirops de sucre ont été utilisés pour ces essais. Nous avons étudié l'influence du pH et de l'eau.

Dans un premier temps nous avons pris 100 g d'EP2, dont le pH est amené à 1,5 à l'aide d'acide phosphorique concentré, puis on ajoute 300 à 400 ml d'éthanol pour provoquer le relargage des constituants macromoléculaires. Le mélange obtenu est abandonné à 4°C en chambre froide pendant 24 heures pour faire achever la précipitation. Le précipité formé est isolé par décantation, puis récupéré avec de l'eau distillée pour le mettre en solution que l'on dialyse en vue de purification. La dialyse a été effectuée contre de l'eau courante pendant 48 heures puis contre de l'eau distillée (2 fois 2 heures). L'adialysat obtenu est lyophilisé puis pesé.

Dans un deuxième temps, et pour étudier l'action de l'eau, 100 g d'échantillon sont additionné d'abord de 100 ml d'eau distillée, puis amené à pH voulu à l'aide de l'acide phosphorique. Le mélange est additionné d'éthanol puis nous avons effectué le même protocole que pour l'échantillon sans eau.

XII. Fractionnement des résidus secs des pulpes de betteraves

Il s'agit de vérifier par analyse directe les structures des pulpes brutes ou traitées. Cette analyse a été effectuée par fractionnement selon la figure 17.

C'est une analyse gravimétrique des résidus de diverses extractions spécifiques. Les filtrats 1 et 2 représentent la fraction soluble des pulpes (sucres simples...), les fractions 3, 4 et 5 représentent la fraction insoluble (pectines, hémicellulose, cellulose, lignine et cendres). C'est dans cette fraction insoluble qu'on retrouve les fibres alimentaires.

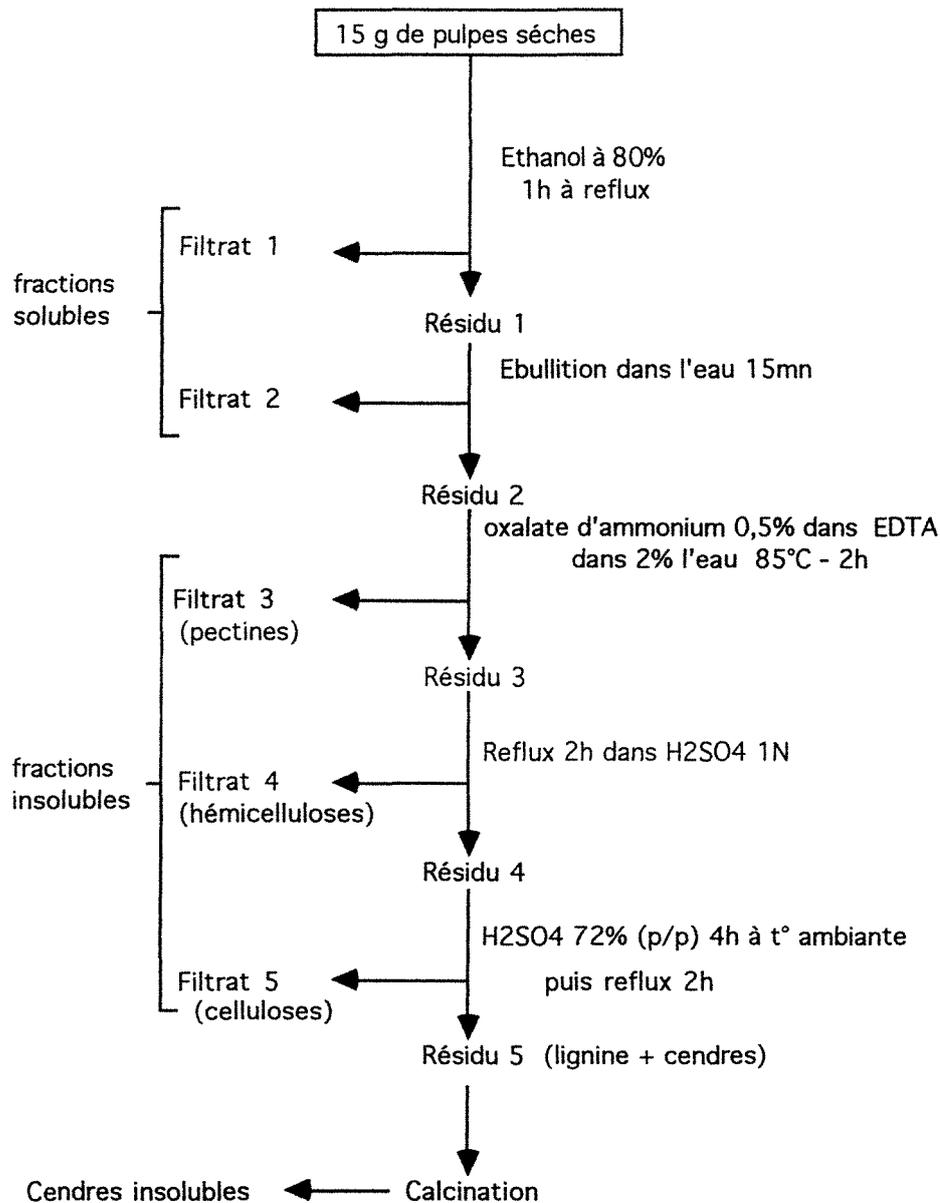


Figure 17: Schéma général de fractionnement des polysaccharides contenus dans les pulpes de betterave

XIII. Décoloration des pulpes par le peroxyde d'hydrogène

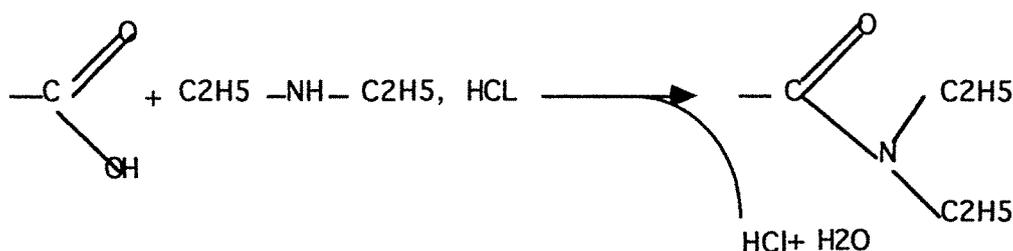
Pour décolorer les pulpes on peut proposer deux traitements l'un fait appel au peroxyde d'hydrogène, l'autre à l'ozone. Nous avons opté pour le premier du fait qu'il est moins onéreux que le deuxième. Il faut noter que les deux traitements aboutissent à d'excellents résultats. Nous nous sommes intéressés à l'études de l'influence de certains paramètres tels que le pH, la température et le temps de réaction.

La détermination de la quantité de peroxyde d'hydrogène consommée à été effectuée par la méthode suivante:

3 Kg de pulpes humide (600g de matière sèche) ont été recouverts avec 11 litres d'une solution d' H_2O_2 à 1,36% soit 0,25g d' H_2O_2 /g de matière sèche. Après trois heures sous agitation à 40°C, la pulpes a été essorée. On récupère de cette manière 8 l de milieu. Les teneurs en peroxyde ont été déterminées dans le milieu réactionnel après décoloration, dans les eaux de lavage et dans la pulpe décolorée et séchée. H_2O_2 a été dosé par potentiométrie en utilisant comme réducteur (l'Hydrogénosulfite de sodium) de concentrations variables selon les teneurs résiduelles en H_2O_2 et un système d'électrodes (calomel, platine).

XIV. Dosage chimiques des -COOH libres totaux

XIV.1. Principe:



XIV.2. Mode opératoire

50mg de poudre de pulpe sont traités à reflux, 2 heures, dans une solution de chlorhydrate de diéthylamine dans le méthanol (10/40)(v/v). La pulpe est ensuite lavée abondamment par un mélange eau distillée + méthanol, puis séchée. Une fois séchée, on détermine le nouveau taux d'azote du produit (soit par KJELDAHL ou mieux par analyse élémentaire)

XIV.3. Dosage de l'azote

XIV.3.1. par la méthode de KJELDAHL.

a. principe

L'attaque des composés contenant de l'azote aminé par H_2SO_4 concentré en présence d'un catalyseur approprié, dont le rôle est d'élever le point d'ébullition de l'acide, permet de transformer intégralement l'azote en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

On entraîne l'azote ammoniacal formé par action d'une lessive alcaline par distillation; NH_3 est recueilli qualitativement dans une solution aqueuse d'acide borique. En fin de distillation, on dose la solution borique ammoniacale par une solution d'acide chlorhydrique titrée.

b. réactifs

- acide sulfurique concentré
- soude à 40 % (p/v)
- catalyseur: sélénium amorphe (1g), CuSO_4 anhydre (1g) et Na_2SO_4 anhydre (50g)
- solution saturée d'acide borique (environ 4% (p/v))
- indicateur coloré: mélange de 0,125g de rouge de méthyle et de 0,083g de bleu de méthylène dans 100ml d'éthanol à 95%.
- solution titrée d'acide sulfurique N/50

c. mode opératoire

On ajoute à 250mg de poudre à analyser, 300mg de catalyseur puis 3ml d'acide sulfurique concentré. On porte les matras préparés en double, à ébullition sur la rampe d'attaque jusqu'à clarification du liquide, la couleur finale étant bleu-verdâtre. En fin de minéralisation tout l'azote combiné est transformé en sulfate d'ammonium. Le contenu des matras refroidis est transvasé dans l'appareil à distiller et rincé 3 fois par 2ml d'H₂O distillée. On introduit alors 15 ml de lessive de soude, en évitant toute fuite de vapeur. La distillation est poursuivie jusqu'à obtenir un volume distillé triple du volume initial de l'acide borique. L'ammoniac ainsi piégé est dosé par HCl N/50; le poids d'azote en g pour 100g de poudre sèche P est exprimé par: $(n \times 0,28 \times 100) / P \times 100 / (100 - H)$ avec:

n = nombre de ml d'HCl utilisé, 1ml d'acide N/50 correspond à 0,28mg d'N.

H= Humidité en poids. La teneur en protéines totale est calculée à partir de la teneur en azote totale multipliée par le facteur 6,25, en admettant qu'il y a environ 16g d'azote par 100g de protéines.

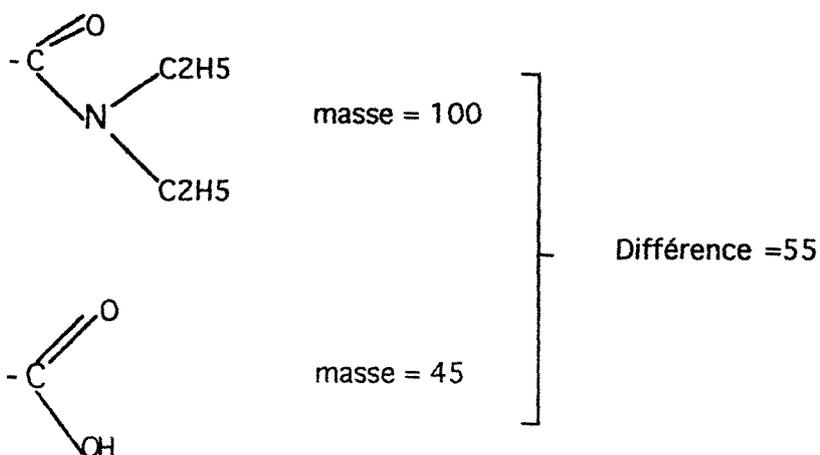
XIV.3.2. Par analyse élémentaire

Ce dosage à l'avantage d'être plus précis et va nous permettre de calculer le nombre de -COOH libre puisqu'à côté de la teneur en azote, on obtient également la teneur en carbone.

Le calcul suivant permet d'obtenir directement le pourcentage de -COOH totale à partir des résultats de l'analyse élémentaires.

La fixation de $\text{HN} \begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{cases}$ entraîne une augmentation de la masse.

Si on part de 100g de matière organique, on obtient $100+(a \times 55)$ g où a représente le % p/p de $-\text{COOH}$ dans 100g de produit.



d'autre part:

Teneur en carbone: Echantillon: $\text{C1} = \frac{n \times 12}{100}$

Echantillon traité: $\text{C2} = \frac{(n \times 12) + (a \times 48)}{100 + (a \times 55)}$

Teneur en azote

Echantillon: $\text{N1} = \frac{m \times 14}{100}$

Echantillon traité: $\text{N2} = \frac{(m \times 14) + (a \times 14)}{100 + (a \times 55)}$

D'où:

$$\frac{\text{C1}}{\text{N1}} = \frac{12n}{14m}$$

or $12n = 100 \text{ C1}$ et $14m = 100 \text{ N1}$

$$\frac{\text{C2}}{\text{N2}} = \frac{12n + 48a}{14a + 14m}$$

$$\frac{\text{C2}}{\text{N2}} = \frac{100 \text{ C1} + 48a}{100 \text{ N1} + 14a} \longrightarrow a = \frac{100 (\text{N2C1} - \text{N1C2})}{14\text{C2} - 48\text{N2}}$$

XV. Rétention des cations par les pulpes.

XV.1. Rétention des ions calcium

Le calcium est apporté au milieu sous forme d'acétate de calcium 0,05M à pH 7,1. Le pHstat est réglée au pH de la solution d'acétate (7,1). Les pulpes doivent être lavées à l'eau distillée avant d'être mises en contact avec la solution d'acétate de calcium. La neutralisation des ions H^+ est suivie au pHstat (pH7,1), par neutralisation avec une solution de NaOH 0,05M pendant 6 minutes.

XV.2. Rétention des ions cuivre.

1g de pulpes sont mises dans 20ml d'eau. Le pH est ajustée au pH de la solution de $CuCl_2$ (pH 5) en présence de $CuCl_2$ 0,04M en large excès (75ml). on suit au pHstat (pH5) pendant 24 heures, la libération des ions H^+ par neutralisation avec une solution de KOH titrée.

XVI. Détermination de la capacité d'échange des cations des pulpes

On considère en effet le plus souvent que les sites d'échanges sont les -COOH non estérifiés des pectines. La méthode développée ici permet en effet de déterminer la fixation du cuivre avant puis après saponification des pectines estérifiées. Le protocole utilisé est le suivant:

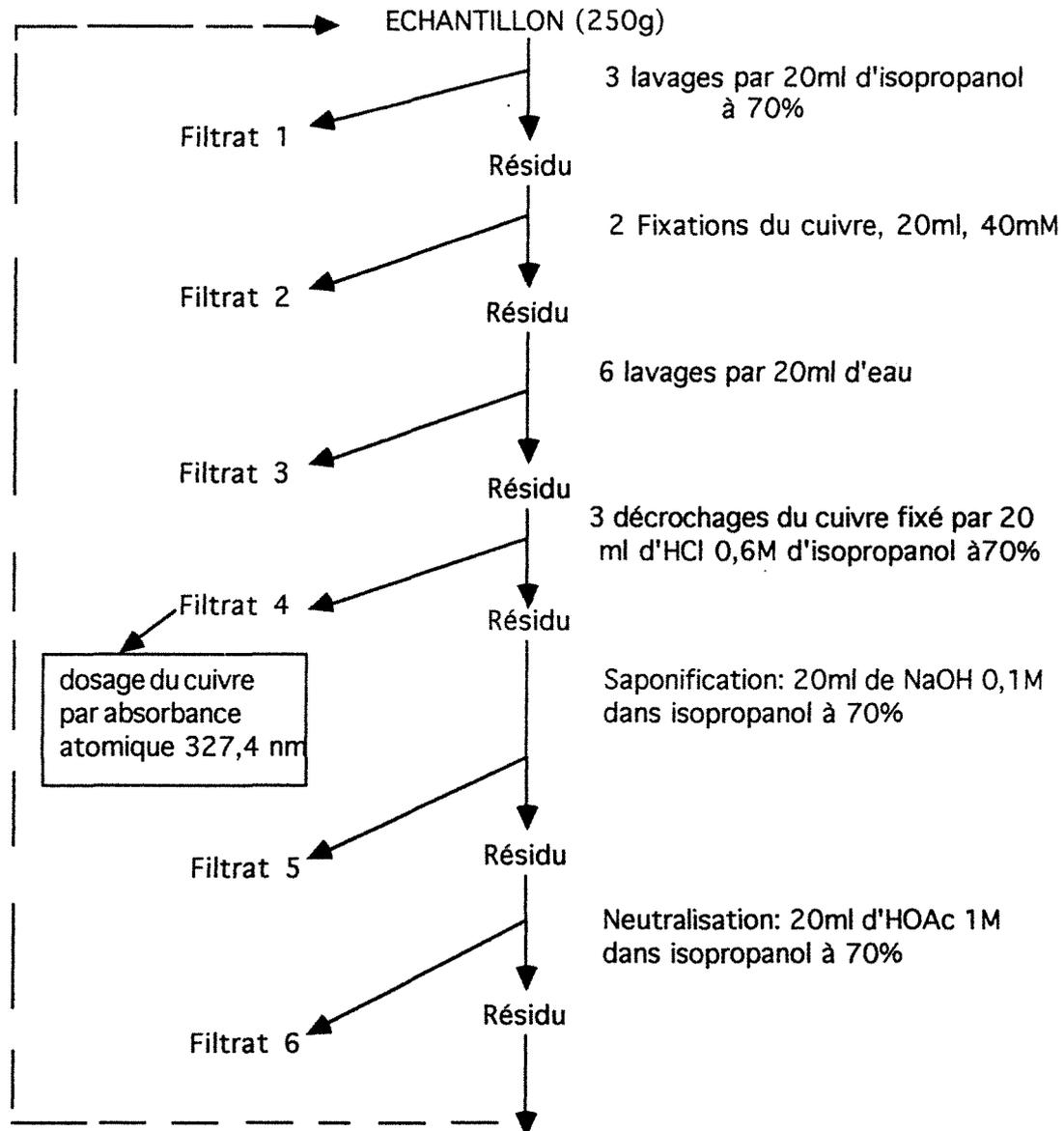


Figure 18 : Protocole du détermination du cuivre avant et après saponification des pectines

XVII. Extraction des lipides présents dans les pulpes.

Après un certain nombre d'essais, nous avons retenu l'extraction à chaux par l'éthanol. Les extractions sont effectuées en batch, sous reflux. La durée de l'extraction est 6 heures. Le milieu est agité doucement, mais en continu. Les conditions expérimentales sont les suivantes:

- éthanol à 66% dans l'eau puis seconde extraction à l'éthanol à 96% dans l'eau.

- éthanol à 66% (v/v)

- éthanol à 96% (v/v)

- éthanol à 80% (v/v)

Après cette extraction les pulpes et les fractions extraites sont analysées selon le protocole suivant:

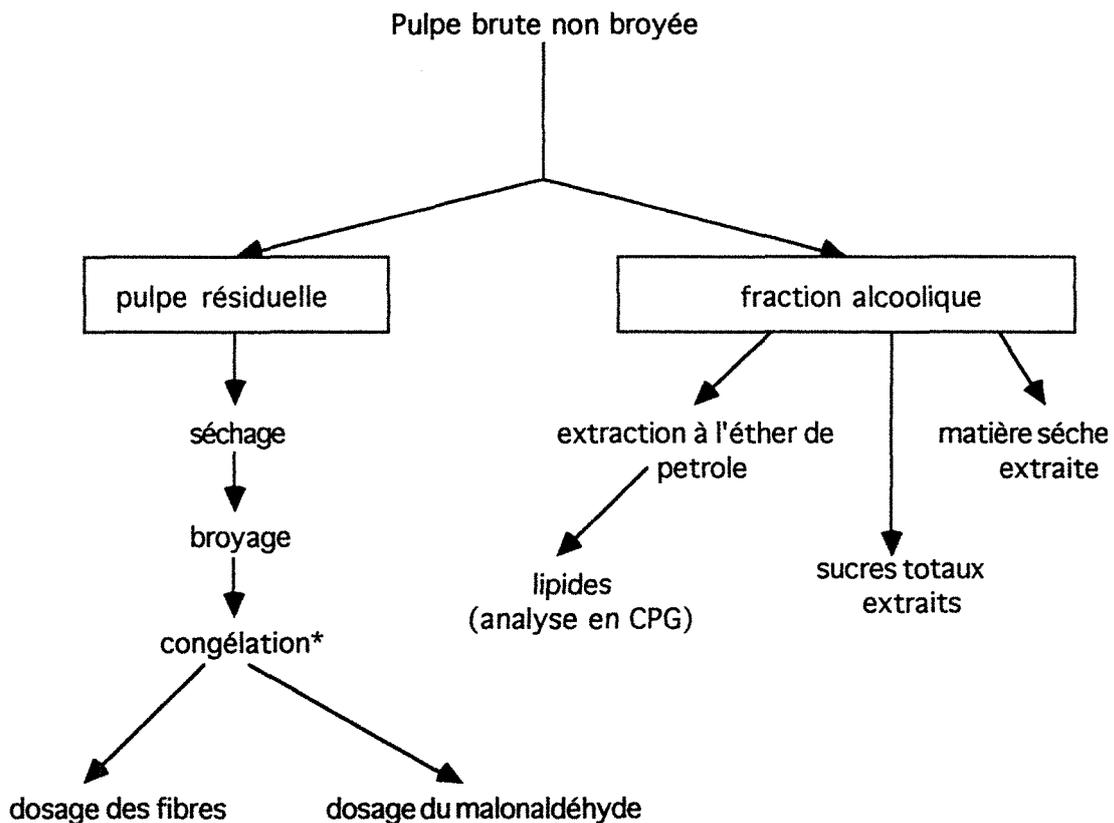


Figure 19 : Schéma du protocole d'extraction des lipides et des analyses ultérieures des pulpes.

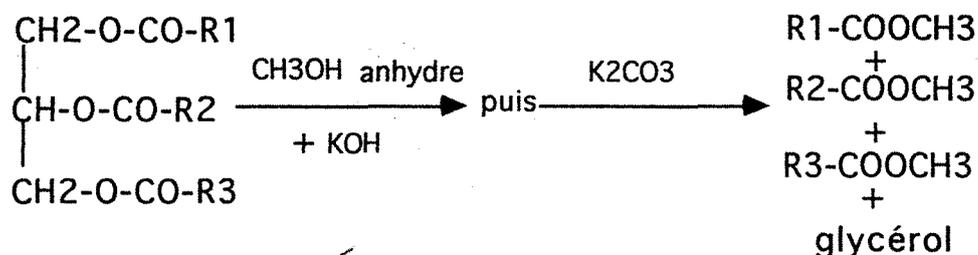
* : Dans tous les cas les échantillons de pulpes sont séchés à l'air de manière à éliminer correctement l'éthanol. Ces échantillons secs sont analysés directement, soit congelés afin d'éviter toute altération des lipides avant les analyses finales.

Sur la fraction alcoolique, on détermine la matière sèche totale afin de connaître la perte de poids qu'entraîne la délipidation. De plus après avoir éliminé l'éthanol de cette fraction nous avons déterminé d'une part la teneur en sucres totaux extraits (méthode colorimétrique de DUBOIS et d'autre part, après extraction à l'éther de pétrole, la teneur en lipides extraits.

XVIII. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse

XVIII.1. Principe

Comme la plus part des produits polaires, les acides gras ne supportent pas le choc thermique de l'injection sans dénaturation. Il est nécessaire de bloquer le groupement COOH. Ce blocage se fera ici par l'obtention de l'ester méthylique de cet acide gras. En fait dans le mode opératoire choisi ici, les triglycérides subissent directement une transestérification par le méthanol en milieu basique anhydre. Les esters méthyliques d'acides gras obtenus seront chromatographiés. La réaction de méthylation est la suivante:



Le carbonate de potassium permet le relargage des esters méthyliques formés. Cette estérification est effectuée à chaud et à reflux dans un bain thermostaté à 75°C pendant 30min.

XVIII.2. Matériels

Colonne: Silar-10CPT10% sur Gaschrom QH, 100/120 mesh (L=3m, diamètre 2mm).

Le silar est une combinaison de phényl et de cyanoalkylpolysiloxanes (Alltech)

Conditions:

- azote= 1,4bar hydrogène=1,0bar air=1,0bar
- atténuation: de 16 à 128
- sensibilité: 10⁻¹⁰ A/mV
- vitesse papier: 10mm/min
- injection: 230°C
- détection: 230°C
- programme: approximativement 150-190°C/min, puis 2min à 190°C.

XVIII.3. Préparation des échantillons

- prélever 1g d'échantillon dans un ballon rôdé de 100ml parfaitement sec
- ajouter 10ml de KOH à 0,35% dans du méthanol sec (sur CaCl₂)
- placer le ballon dans un bain marie thermostaté à 75°C et adapter un réfrigérant à reflux. Laisser à reflux pendant 30minutes.
- ajouter ensuite 10ml de K₂CO₃ à 5% et agiter, verser dans une ampoule à décanter de 100ml et ajouter 10ml d'hexane. Recueillir cette phase dans un tube à vis de 18 ml. Prélever 1 μ de l'extrait hexane et injecter dans la colonne du chromatographe.

RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE I

FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE
D'ECHANTILLONS INDUSTRIELS DE SIROPS DE
SACCHAROSE ISSUS DE DIFFERENTES
FABRICATIONS

I. Introduction

La qualité d'un sucre est déterminée selon une norme dite des Points Européens qui est la somme de trois notes définissant l'aspect du sucre, la coloration d'une solution de ce sucre et les cendres (voir Matériel et méthodes). Cette qualité est donc fonction des deux critères de caractérisation des non sucres (NS): les colorants et les cendres

Un grand nombre d'auteurs ont essayé de relier ces deux critères à la qualité. Ainsi Ponant (1985) a trouvé une relation entre les points CEE et la pureté de la masse cuite. Rappelons que la pureté est la quantité de saccharose en % de matières sèches.

Rousseau (1985) a relié les points CEE à la coloration de cette masse cuite. Cependant cette prévision n'est plus utilisable si des paramètres du process sont modifiés. La prise en compte de la seule pureté ou de la couleur ne suffisent donc pas à expliquer ou à prévoir la qualité des sucres.

Il est donc nécessaire de rechercher d'autres constituants des NS intervenant sur cette qualité.

La Générale Sucrière et la société Rohm et Haas ont mis au point une méthode performante de déminéralisation des produits de sucrerie appelée "Nouvelle déminéralisation" qui utilise en fait deux résines échangeuses d'ions (anions et cations) dont le rôle est à la fois de déminéraliser mais aussi de décolorer les produits traités.

Pour des raisons économiques, la nouvelle déminéralisation n'a pas été exploitée industriellement, elle a cependant permis de faire deux observations importantes:

- Après ce traitement de "nouvelle déminéralisation", on note une amélioration sensible de la qualité des sucres blancs mais aussi celle du sucre roux.

- La résine anionique perd plus rapidement sa capacité d'échange qu'une résine classique, ce qui nous a amené à nous pencher sur les substances pouvant provoquer son empoisonnement.

Les sucriers danois de la DDS ont mis au point une technologie (Madsen 1986) qui permet d'obtenir des sucres d'excellente qualité, cette amélioration est surtout sensible sur les sucres roux, et le rapport moyen coloration sucre roux d'Eppeville/coloration sucre roux danois est de 17,5 alors que le rapport coloration sucre roux non déminéralisés/ coloration sucres roux déminéralisés = 15,6 ce qui est somme toute du même ordre de grandeur.

Cette similitude entre les produits danois et produits d'Eppeville ayant subi une nouvelle déminéralisation nous a fait penser que ce traitement de déminéralisation permettait d'éliminer des produits présents normalement dans les produits d'Eppeville, mais que la technologie danoise semble savoir éviter.

Nous avons donc entrepris de rechercher en fractionnant en particulier les égouts pauvres (EP) si on pouvait mettre en évidence des différences de composition entre des produits d'Eppeville et des mêmes produits provenant d'une sucrerie danoise. Pour cela nous avons tout d'abord entrepris logiquement un fractionnement sur échangeur d'ions.

II. Comparaison entre un EP2 d'Eppeville et un EP2 danois

II.1. Préparation des échantillons

II.1.1. ultrafiltration

Afin d'étudier la composition macromoléculaire des échantillons il est toujours nécessaire d'éliminer le saccharose; nous avons donc procédé ici à une ultrafiltration directe. Cette étape nécessite toutefois une dilution avec de l'eau afin d'obtenir une ultrafiltration suffisamment rapide, notons que l'ultrafiltration a été déjà utilisée par Shin, (1985) pour l'analyse et la caractérisation des impuretés du sucre de canne. En fait pour étudier en même temps la répartition des poids moléculaires, nous avons réalisé deux ultrafiltrations successives:

- La première ultrafiltration est effectuée sur membrane PM10 (Amicon) de point de coupure 10000 daltons. On obtient dans ces conditions un rétentat qui incorpore toutes les molécules de poids moléculaire supérieur à 10000.

- L'ultrafiltrat qui en résulte est à nouveau ultrafiltré sur une membrane YM2 (Amicon) de point de coupure 2000 daltons, on obtient ainsi un nouveau rétentat dont les molécules ont un poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 daltons.

- L'ultrafiltrat ne contient plus alors que des petites molécules et en particulier tout le saccharose

II.1.2. Dialyse

A des fins de comparaison nous avons également soumis nos échantillons à une dialyse à fin de pouvoir éliminer les petites molécules et en particulier le saccharose. Cette dialyse a été effectuée à l'aide d'une membrane en cellulose régénérée dont le point de coupure est de 8000.daltons On a opéré à la température de 4°C.(Matériel et Méthodes)

II.2. Etude des fractions ultrafiltrées.

Nous étudierons successivement le comportement d'un EP2 d'Eppeville et d'un EP2 danois ultrafiltrés lors d'une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Sepharose CL 6B (Pharmacia).

La manipulation est décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes, cependant rappelons que la colonne de DEAE Sepharose CL 6B est équilibrée avec du tampon phosphate 0,05 M pH 4,8. Après chargement de la colonne, on élue les entités moléculaires non retenues avec ce même tampon, puis on augmente progressivement la force ionique du milieu en ajoutant au tampon du NaCl de façon à obtenir les concentrations de 0,05M, 0,5M, 1M et 2M en NaCl. A chaque fois on attend que les entités moléculaires libérées par l'augmentation de la force ionique soient éluées de la colonne avant de changer d'éluant de force ionique plus forte.

La détection des composés élués est réalisée par absorption à 280nm. Le choix de cette longueur d'onde a été fait en fonction de l'absorption des impuretés contenues dans tous les cas des produits analysés. De plus nous avons étudié deux autres paramètres notamment la concentration en sucres totaux et le pouvoir réducteur global des différentes fractions récupérées.

II.2.1. Etude des fractions de poids moléculaires supérieurs à 10000 daltons

Sur DEAE Sepharose CL 6B on obtient cinq fractions.

On remarque (figure 20 et 21) qu'il y a davantage de produits non retenus par la résine (avant l'addition de la première concentration en NaCl) pour l'EP2 danois que pour l'EP2 d'Eppeville. L'EP2 danois contient donc relativement plus de produits non chargés non retenus, qui sortent rapidement de la colonne, élués par le seul tampon phosphate. La presque totalité des produits retenus initialement sur la colonne (que ce soit pour l'EP2 d'Eppeville ou pour l'EP2 danois) sont élués par une force ionique peu élevée (0,5M de NaCl), ce qui traduit qu'ils sont en fait relativement peu chargés.

Ajoutons aussi que les pics d'absorption (DO 280 nm) (phénols, protéines....) sont nettement plus importants dans le cas de l'EP2 danois que de l'EP2 d'Eppeville. Notons que dans les deux types d'échantillon la fraction éluee avec une concentration 0,5M de NaCl est la plus colorée, les autres fractions sont relativement incolores ou peu colorées. Dans la littérature la formation de pigments bruns, est attribuée à des réactions chimiques entre sucres réducteurs (en particulier fructose et glucose) et les acides aminés qui sont toujours présents dans les solutions de sucres (Carruthers et col. 1963), (Schiweck et col. 1974) et (Reinefeld et col. 1971), on attribue aussi ces substances colorées à des polymères de condensation entre polysaccharides, protéines et phénols (Poel et col.1964).

En ce qui concerne le pouvoir réducteur des fractions éluées (Figure 20 et 21) avec le seul tampon phosphate, la fraction non chargée de l'EP2 d'Eppeville est nettement plus réductrice que la fraction non chargée de l'EP2 danois. Au contraire, dans l'EP2 danois ce sont les fractions les plus chargées et notamment celles éluées avec NaCl 0,5M qui sont les plus réductrices.

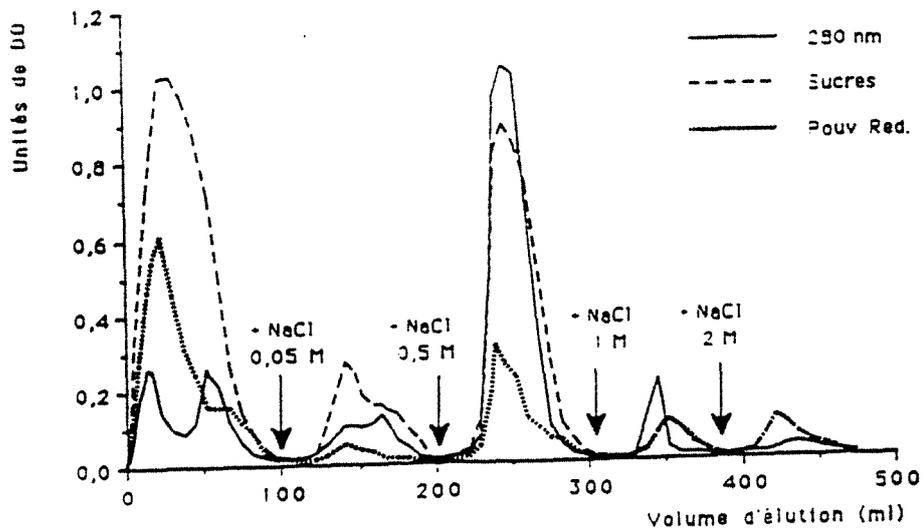


Figure 20: Chromatographie sur DEAE Sépharose CL 6B du rétentat de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons de l'EP2 d'Eppeville Eluant: Tampon phosphate pH 4.8 et 0.05M, puis le même tampon est additionné de NaCl 0.05M, de NaCl 0.5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

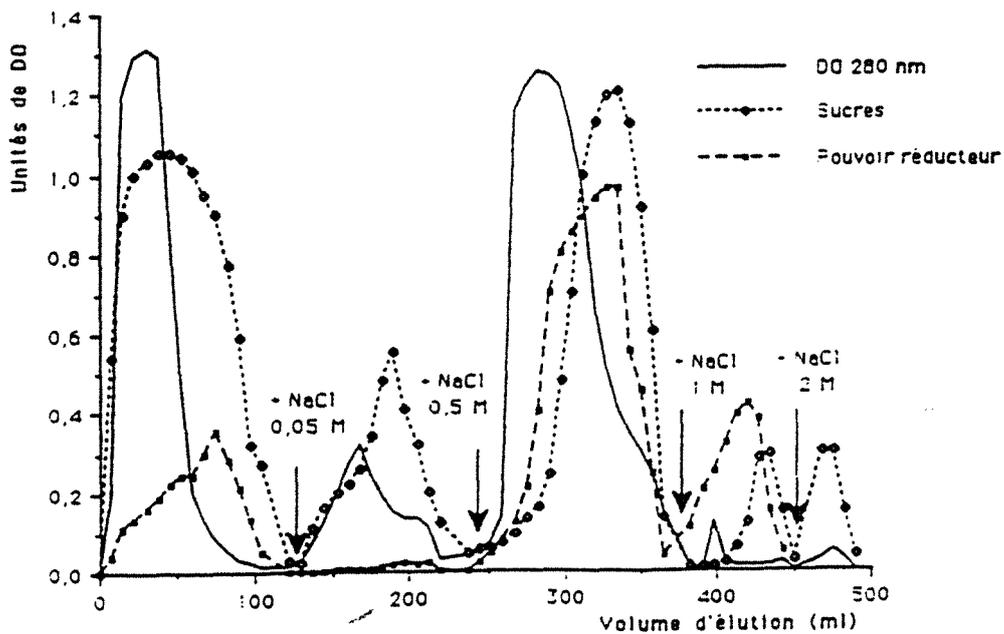


Figure 21: Chromatographie sur DEAE Sépharose CL 6B du rétentat de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons de l'EP2 danois Eluant: Tampon phosphate pH 4.8 et 0.05M, puis le même tampon est additionné de NaCl 0.05M, de NaCl 0.5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

II.2.2. Etude des fractions de poids moléculaires comprises entre 2000 et 10000 daltons

Les figures 22 et 23 nous montrent qu'il existe assez peu de différences entre les échantillons français et danois. Cependant, de la même manière que précédemment on note que les produits non retenus par la résine et qui sortent en tête sont là encore plus importants pour l'EP2 danois que pour l'EP2 d'Eppeville.

Les profils d'élution nous montrent cependant qu'un certain nombre de molécules de poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 de l'EP2 danois sont plus chargées que celle de l'EP2 d'Eppeville. Il faut en effet une force ionique équivalente à 1M de NaCl pour décrocher la totalité des produits déposés sur la colonne dans le cas de l'EP2 danois. En revanche une concentration de 0,5M en NaCl suffit pour décrocher la presque totalité des produits chargés de l'EP2 d'Eppeville.

Enfin le dosage des sucres totaux contenus dans les différentes fractions issues de l'élution des EP2 danois et d'Eppeville n'ont pas montré de différences notables. On note cependant dans l'EP2 danois un pouvoir réducteur important dans la fraction non retenue, qui tend à s'atténuer dans les fractions suivantes 0,05M, 0,5M et 1M de NaCl avant de devenir très faible dans la dernière fraction éluee avec NaCl 2M. Ce résultat est nettement différent de celui obtenu avec la fraction de poids moléculaire supérieure à 10000 daltons pour laquelle nous avons observé l'inverse.

II.2.3. Conclusion

La détermination sur chaque fraction de la teneur en oses totaux et du pouvoir réducteur a permis de montrer comparativement que la fraction de poids moléculaire supérieure à 10000 daltons de l'EP2 danois

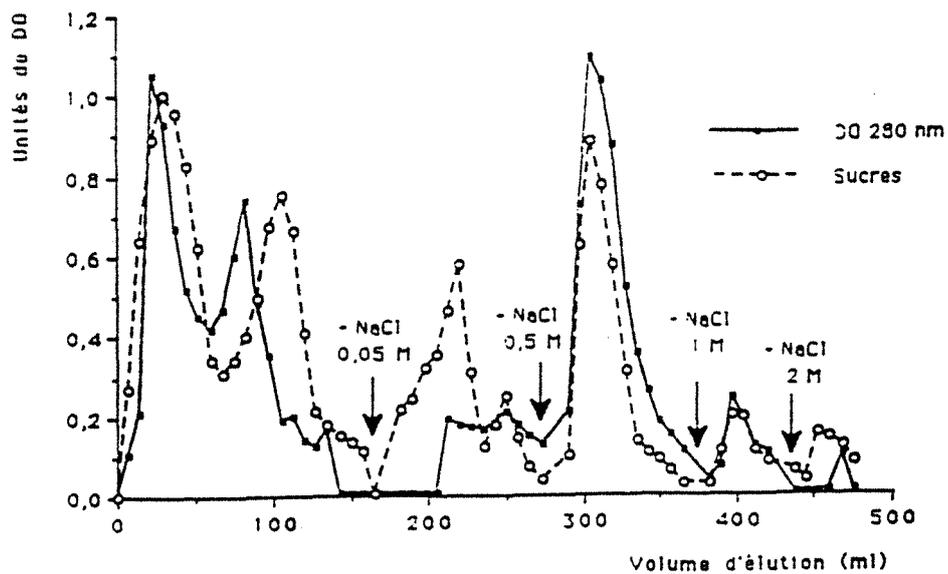


Figure 22: Chromatographie sur DEAE Sépharose CL 6B des produits de poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 daltons de l'EP2 d'Eppeville Eluant: Tampon phosphate pH 4,8 et 0,05M, puis le même tampon est additionné de NaCl 0,05M, de NaCl 0,5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

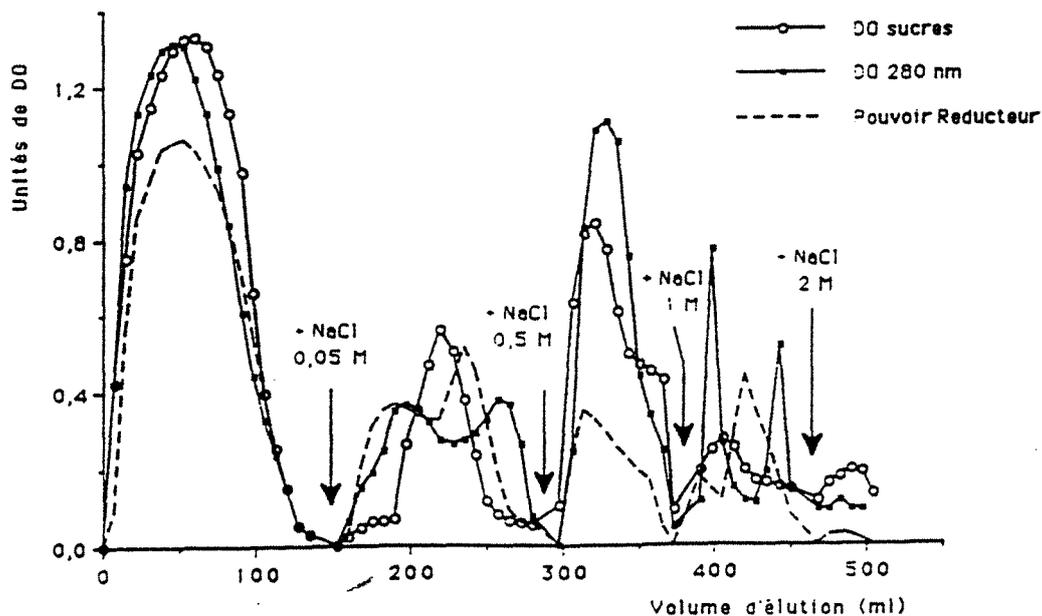


Figure 23: Chromatographie sur DEAE Sépharose CL 6B des produits de poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 daltons de l'EP2 danois Eluant: Tampon phosphate pH 4,8 et 0,05M, puis le même tampon est additionné de NaCl 0,05M, de NaCl 0,5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

contenait davantage de polyosides de caractère non chargé que la fraction correspondante de l'EP2 d'Eppeville ce qui implique inversement une teneur relative en polyosides chargés plus élevée pour l'EP2 d'Eppeville. En revanche pour la fraction de poids moléculaire comprise entre 2000 et 10000 les différences de composition des échantillons sont beaucoup moins marquées.

III. Comparaison entre ultrafiltration et dialyse pour la récupération des macromolécules.

Nous avons voulu comparer le comportement du surnageant issu de la centrifugation de l'adialysat de l'EP2 d'Eppeville, au travers d'une membrane de cellulose régénérée de point de coupure 8000 daltons avec l'afiltrat du même EP2 sur membrane Amicon PM 10 de point de coupure 10000 daltons.

Cette comparaison consiste à passer séparément les deux fractions sur DEAE Sepharose CL.6B, puis à étudier l'évolution de trois paramètres qui sont la concentration en sucres totaux, l'absorption à 280nm et le pouvoir réducteur global.

D'une manière générale les profils d'élution obtenus (figures 20 et 24) à partir de l'échantillon ultrafiltré et du surnageant de l'adialysat sont très peu différents. Ce résultat permet de considérer que les deux types de préparation de l'échantillon (dialyse et ultrafiltration) sont équivalents tout au moins pour la fraction de poids moléculaire supérieure à 10000 daltons. Ceci permettra alors de procéder, selon les conditions analytiques soit à l'ultrafiltration soit à la dialyse avec la certitude d'obtenir des fractions de composition très voisine.

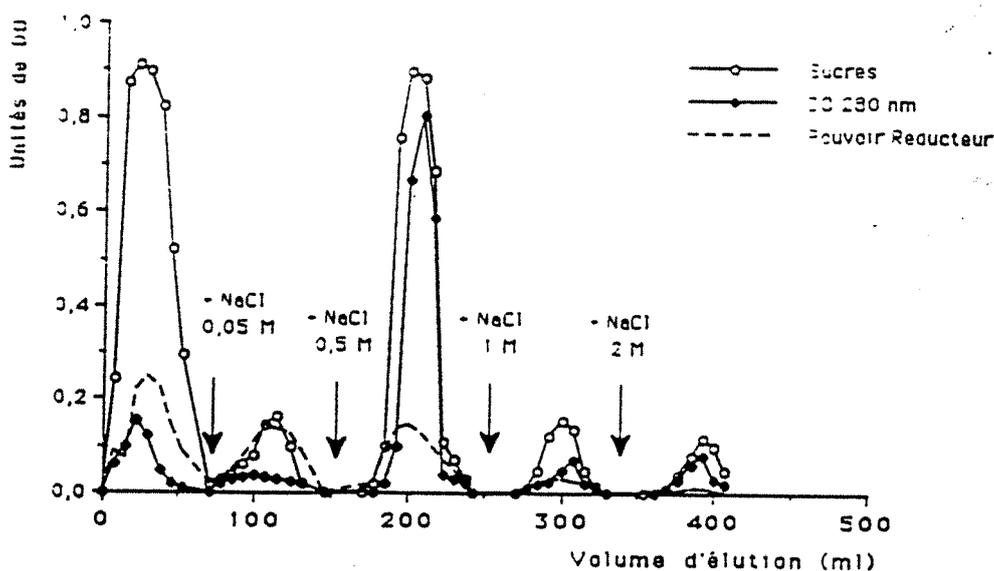


Figure 24: Chromatographie sur DEAE Sépharose CL 6B de l'adialysat de l'EP2 d'Eppeville
 Eluant: Tampon phosphate pH 4,8 et 0,05M, puis le même tampon est additionné de NaCl
 0,05M, de NaCl 0,5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la
 teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

IV. Etude du comportement d'un EP2 d'Eppeville vis à vis de résines Sepharose et Amberlite.

La résine Amberlite IRA 35 S est la résine anionique utilisée industriellement dans le procédé de "Nouvelle déminéralisation". Il était donc intéressant de comparer les résultats obtenus précédemment sur support analytique classique (DEAE Sepharose CL 6B) aux résultats obtenus sur ce support industriel. Rappelons ici qu'après un certain nombre de cycle industriels utilisation-régénération cette résine IRA 35S perd progressivement sa capacité d'échange. De prime abord, on peut penser que si cette résine est progressivement polluée, elle l'est peut-être par des substances normalement retenues mais mal éluées.

La résine Amberlite IRA 35S utilisée, a été tamisée à une granulométrie comprise entre 100 et 200 μm afin de pouvoir être utilisée plus efficacement en colonne. (1,6cm de diamètre et 12cm de long) Il faut rappeler que cette résine a une capacité d'échange (quand elle est neuve) d'environ

5,3 milliéquivalents par gramme (sec) alors que celle de la résine DEAE Sepharose CL 6B n'est que de 15 +2 meq par 100ml ce qui correspond à 0,6 meq par gramme (sec).

On procède de la même manière et dans les mêmes conditions qu'avec la résine Sepharose CL.6B.

IV.1. Fractionnement de l'afiltrat de l'EP2 d'Eppeville de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons

En comparant les profils d'élution des deux résines DEAE Sepharose CL.6B et Amberlite IRA 35 S (figure 20 et figure 25), on observe assez peu de différences. Il faut noter tout de même une plus forte rétention des produits absorbants à 280 nm sur Amberlite IRA 35 S que sur DEAE Sépharose pour laquelle une concentration de 0,5M de NaCl est suffisante pour décrocher la presque totalité des produits chargés. En revanche sur Amberlite, NaCl à la concentration de 0,5M ne décroche qu'une partie des produits retenus.

IV.2. Fractionnement de l'afiltrat d'EP2 d'Eppeville de poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 daltons.

La comparaison entre le comportement des deux résines, Sepharose et Amberlite, (Figure 21 et 26) montre que les produits non retenus par l'Amberlite présentent une teneur en sucre importante. Par contre nous avons trouvé une teneur en sucres très faible voire négligeable dans les fractions correspondant aux substances chargées. Ce n'est pas le cas pour le fractionnement sur Sepharose. C'est là peut être une bonne méthode pour caractériser les non sucres qui peuvent être identifiés aux produits chargés retenus par l'Amberlite. On note aussi l'importance de la fraction

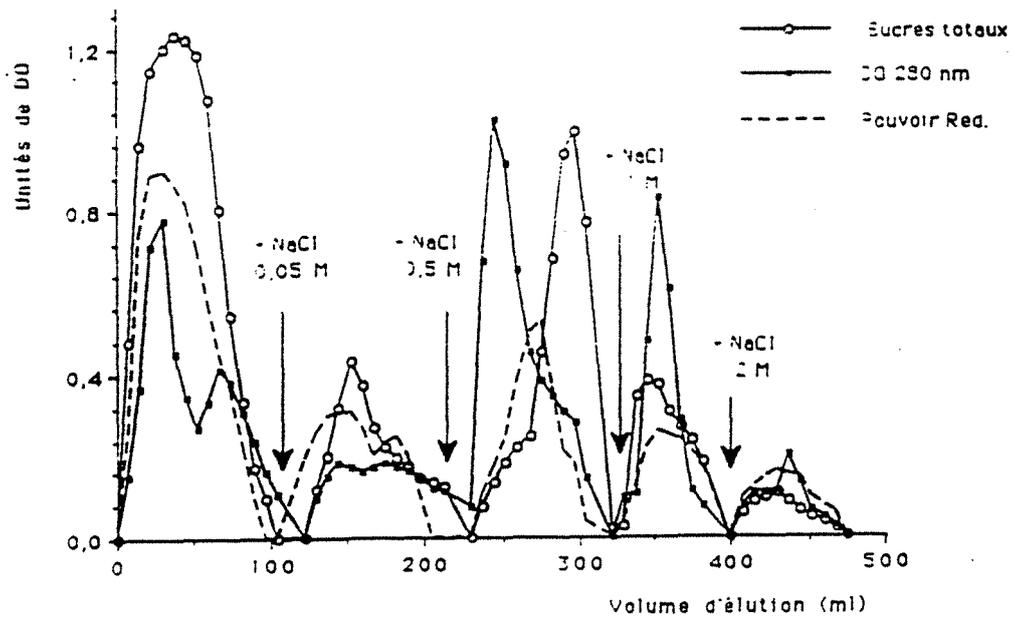


Figure 25: Chromatographie sur Amberlite IRA 35S du rétentat de poids moléculaire supérieur à 10000 daltons de l'EP2 d'Eppeville Eluant: Tampon phosphate pH 4.8 et 0.05M, puis le même tampon est additionné de NaCl 0.05M, de NaCl 0.5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

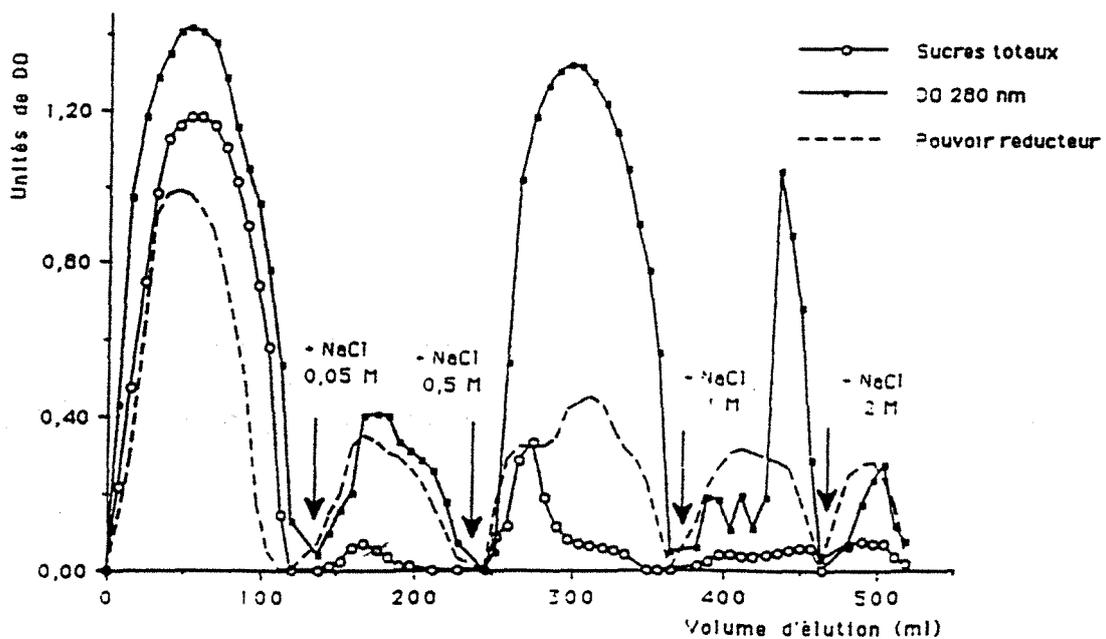


Figure 26: Chromatographie sur Amberlite IRA 35S des produits de poids moléculaire compris entre 2000 et 10000 daltons de l'EP2 d'Eppeville Eluant: Tampon phosphate pH 4.8 et 0.05M, puis le même tampon est additionné de NaCl 0.05M, de NaCl 0.5M, de NaCl 1M et en fin de NaCl 2M. On suit l'absorption à 280nm la teneur en sucres totaux et enfin le pouvoir réducteur (DO à 700nm)

absorbant à 280nm retenue par l'Amberlite et qui nécessite une concentration de 0,5M de NaCl pour être décrochée. Tout se passe comme si avec la résine Amberlite IRA 35S de caractère hydrophobe plus élevé on retenait mieux certains produits absorbants dans l'UV à 280nm et de PM < 10000 daltons.

V. Etude comparative de l'EP2 déminéralisé par "Nouvelle déminéralisation" et l'EP2 non déminéralisé.

Rappelons que la "nouvelle déminéralisation" conduit à des produits ne présentant plus de problèmes de turbidité ni de mauvaise cristallisation. Afin de contrôler cette observation nous avons chromatographié un échantillon d'EP2 d'Eppeville ayant subi un traitement de "nouvelle déminéralisation" et le même EP2 n'ayant pas subi ce traitement.

Le mode opératoire utilisé jusqu'alors était lourd et nécessitait des éluions relativement longues, nous avons donc miniaturisé le système d'analyse (colonne de 1cm² sur 10 cm de haut) et diminué le nombre de palier de différentes forces ioniques en ne conservant que les concentrations en NaCl de 0,05M et 0,5M, puis la colonne est lavée à l'aide de NaCl 2M. Lors de chaque essai, quand la colonne a été équilibrée par le tampon phosphate 0,05M , pH 4,8, on dépose 1,00 g d'échantillon. Malgré l'imperfection de cette détermination, seule la DO à 280 nm a été suivie en routine. La manipulation se déroule comme précédemment, mais elle est plus rapide ce qui permet de faire un plus grand nombre d'essais.

La figure 27 rapporte les résultats obtenus avec l'EP2 d'Eppeville non traité , on retrouve bien le même type de profil que dans le mode opératoire précédent, on notera en particulier un pic important élué de la colonne à l'aide du tampon phosphate additionné de NaCl 0,5M.

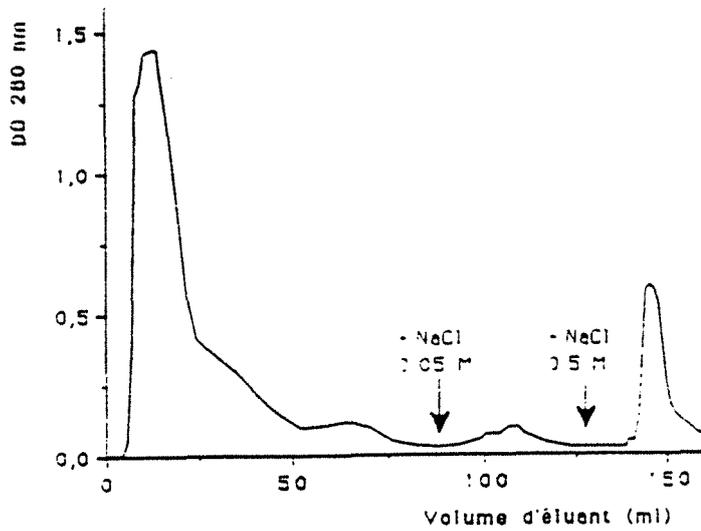


Figure 27: Chromatographie sur résine DEAE Sépharose CL 6B d'un EP2 d'Eppeville non traité Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,05M, puis de NaCl 0,5M

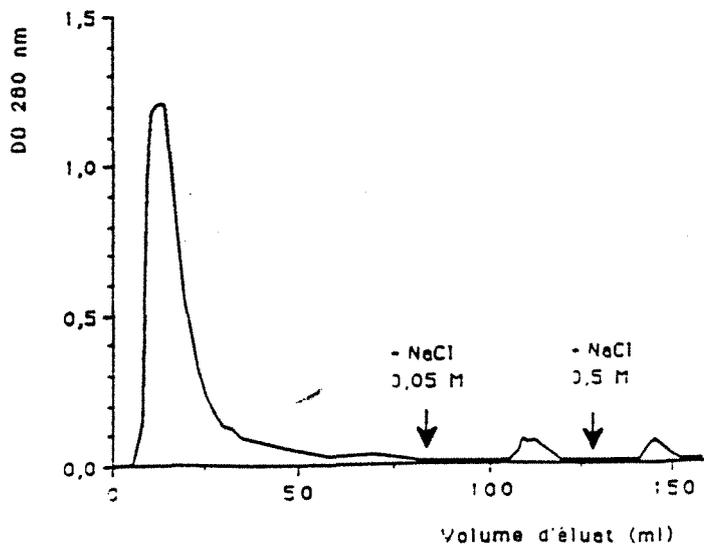


Figure 28: Chromatographie sur résine DEAE Sépharose CL 6B d'un EP2 d'Eppeville passé au préalable sur "Nouvelle déminéralisation" Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,05M, puis de NaCl 0,5M

La figure 28 rapporte les résultats obtenus avec l'EP2 d'Eppeville traité industriellement par "nouvelle déminéralisation". On remarque immédiatement la disparition presque totale des fractions retenues sur la colonne et normalement éluées en ajoutant du NaCl au tampon. Le traitement est donc très efficace pour éliminer les macromolécules chargées. On remarque de plus que le pic correspondant aux produits non chargés est légèrement plus petit, il n'est plus suivi d'épaulement comme dans le cas du même échantillon non traité.

VI. Comparaison d'échantillons issus de sucreries Danoise et Allemande et de la sucrerie d'Eppeville.

VI.1. Chromatographie d'exclusion stérique.

Cette technique de chromatographie d'exclusion stérique a été utilisée par Menier (1989) pour la détermination des composés de haut poids moléculaire responsables de la coloration des jus de sucrerie, elle a été aussi utilisée dans le même domaine par Shore et col. (1984)

Les échantillons sont chromatographiés sur colonne de Trisacryl GF.05 (I.B.F.) (colonne de 45 cm sur 1,6 cm de diamètre interne) dont l'exclusion est de 3000 daltons, aussi l'utilisation d'une telle résine va nous permettre de séparer rapidement les macromolécules présentes des petites molécules et en particulier du saccharose. L'éluion se fait à l'eau distillée, la détection des substances éluées de la colonne est réalisée par l'absorption dans l'UV à 280nm (une vérification par détection à l'aide d'un réfractomètre différentiel a été réalisée lors de la mise au point de la méthode).

Nous avons partagé l'éluat en deux fractions:

- La fraction (F₁), exclue du gel, contient essentiellement des macromolécules, dont les substances colorées.

- La fraction (F₂), cette fraction incolore en solution conduit à un produit blanc après séchage. Elle contient essentiellement du saccharose et des sels minéraux (La présence de saccharose a été vérifiée sur couche mince de silice Merck).

Nous nous sommes intéressés d'abord à l'étude par chromatographie sur Trisacryl GF05 des sirops, des EP2 et des sucre roux provenant de différentes sucreries: française (Epeville: A), danoises (Nakskov: B et Saxkopig: C) et allemande (Appeldorn: E).

VI.1.1. Etude des sirops, des EP2 et des sucre roux

Chaque échantillon a donc été chromatographié sur colonne de Trisacryl GF 05, les diagrammes d'élution sont reportés sur les figures 29, 30, 31 et 32. Sur chaque profil on observe bien les deux fractions F₁ (PM > 3000 daltons) et F₂ (PM < 3000 daltons), à la fin de l'élution les contenus des tubes correspondant à chacune de ces fractions ont été rassemblés, puis lyophilisés et pesés en suite. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.

Les résultats obtenus diffèrent selon qu'il s'agit de sirop, EP2 ou de sucre roux. Ainsi on remarque que les EP2 contiennent plus de macromolécules que les sirops: 4,10% de macromolécules pour le sirop de A, alors que l'EP2 de A en contient 13,50% la même observation s'applique aussi pour les produits danois : sirop de B: 2,98%, EP2 de B: 13,1%.

En revanche, ces résultats nous montrent qu'il y a peu de différences selon qu'il s'agit d'un échantillon issu d'Epeville , de Nakskov ou de Saxkopig. Par contre les EP2 de C sont très riches en macromolécules (17,8% contre 13% pour les autres échantillons).

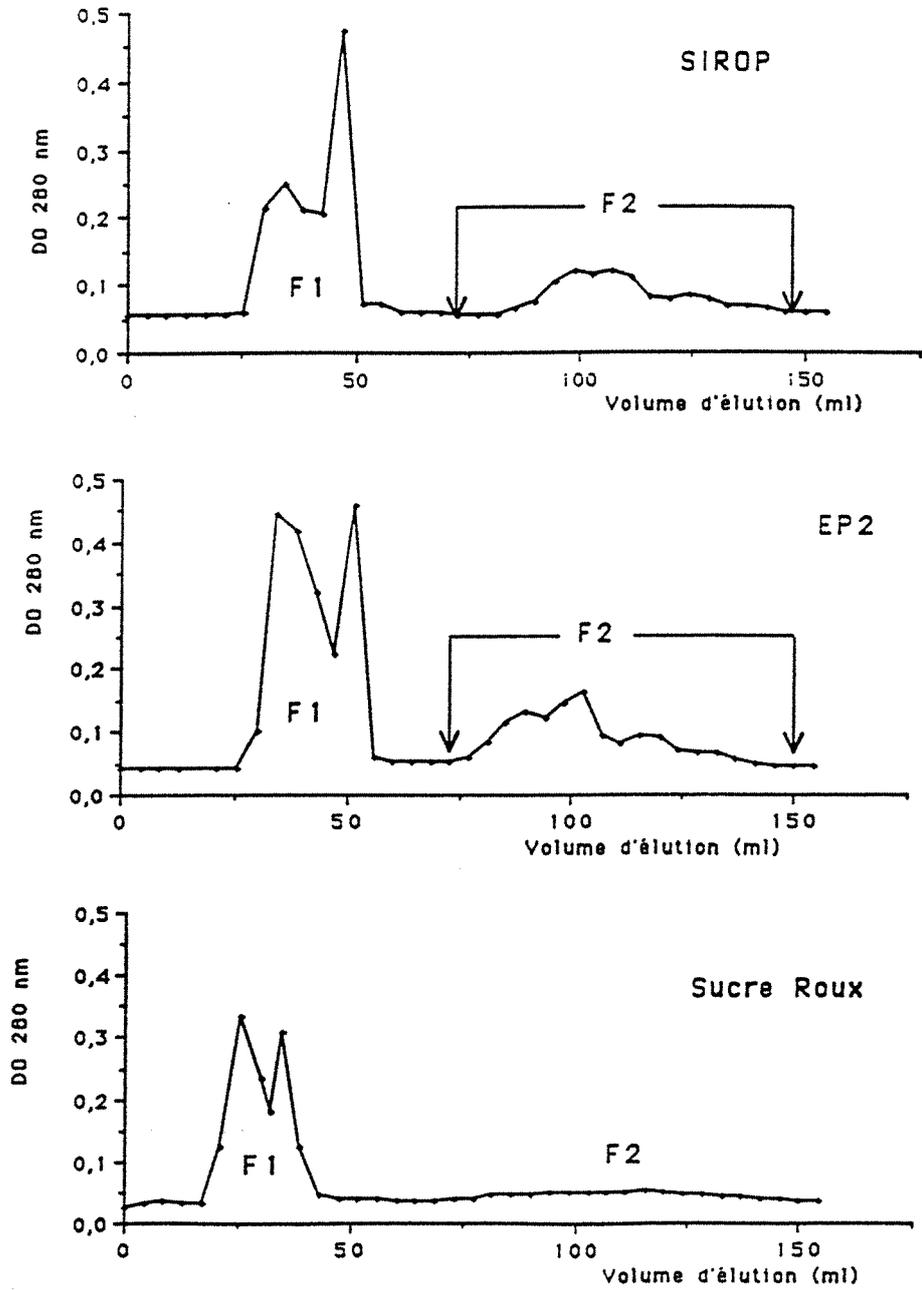


Figure 29: Fractionnement sur gel de Trisacryl GF 05 d'un sirop, d'un EP2 et d'un sucre roux d'Eppeville Dépôt: 1g d'échantillon à 70 brix. Elution: Eau 30ml:heure

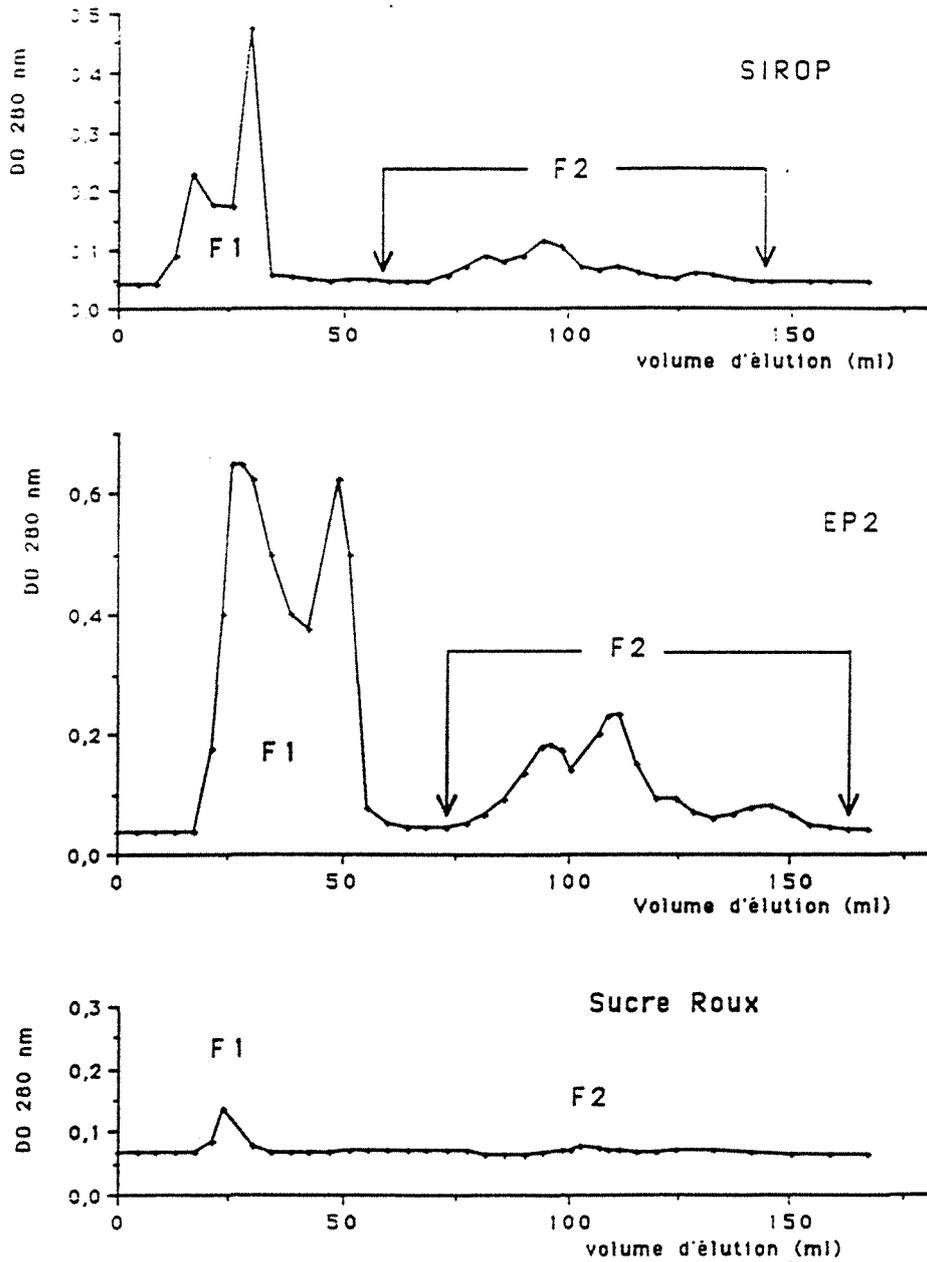


Figure 30: Fractionnement sur gel de Trisacryl GF 05 d'un sirop, d'un EP2 et d'un sucre roux de Nakskov (Danemark) Dépot: 1g d'échantillon à 70 brix, Elution: Eau 30ml:heure

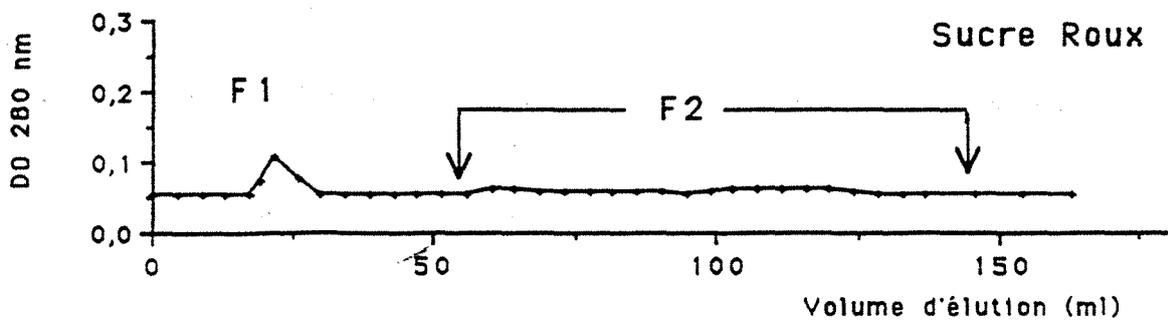
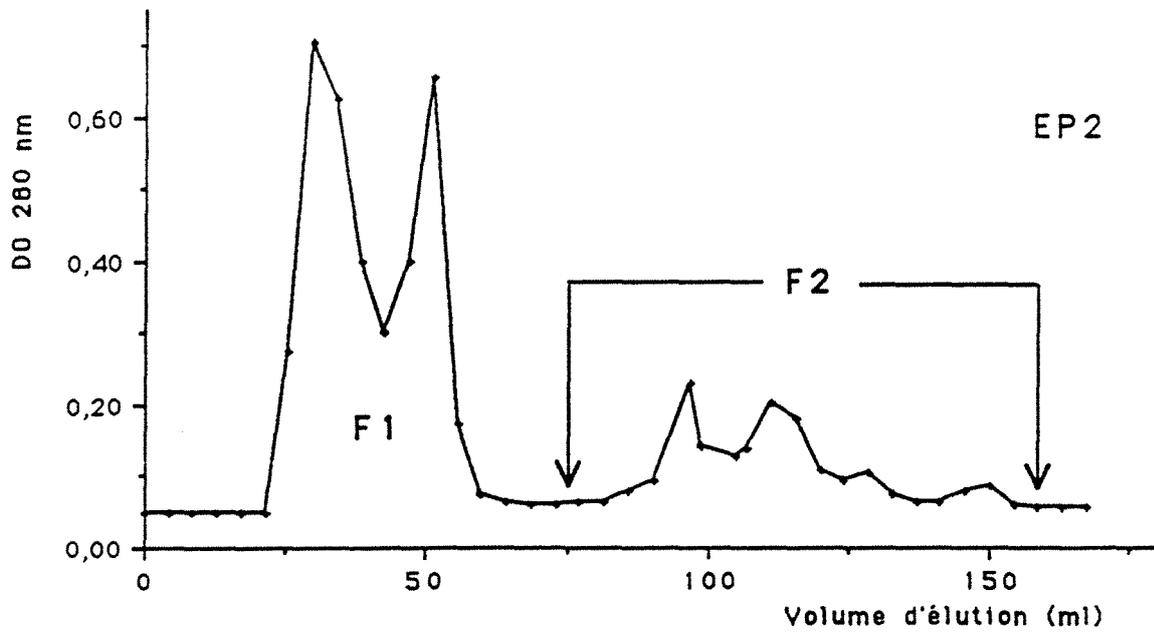
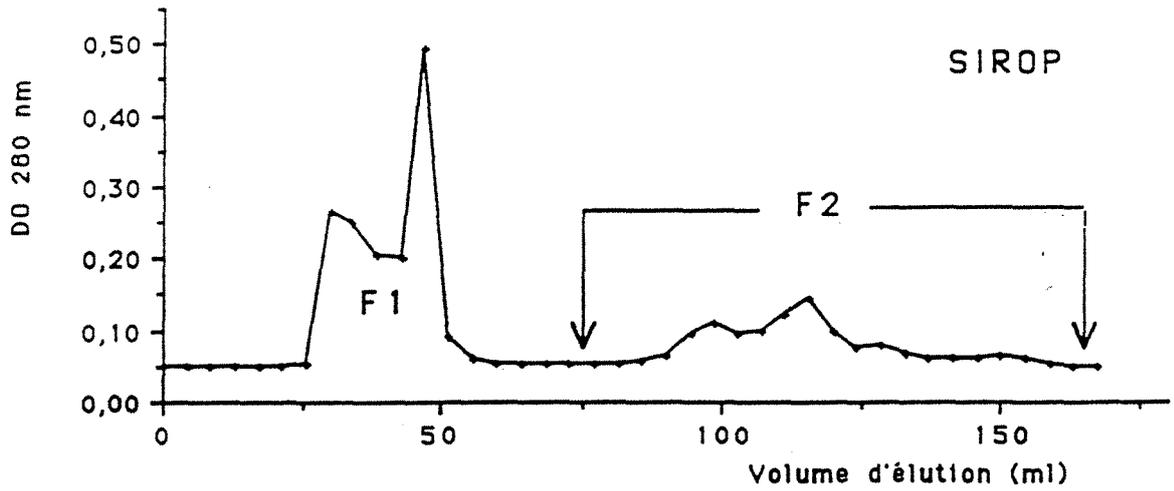


Figure 31: Fractionnement sur gel de Trisacryl GF 05 d'un sirop, d'un EP2 et d'un sucre roux de Saxköpig (Danemark) Dépot: 1g d'échantillon à 70 brix, Elution: Eau 30ml:heure

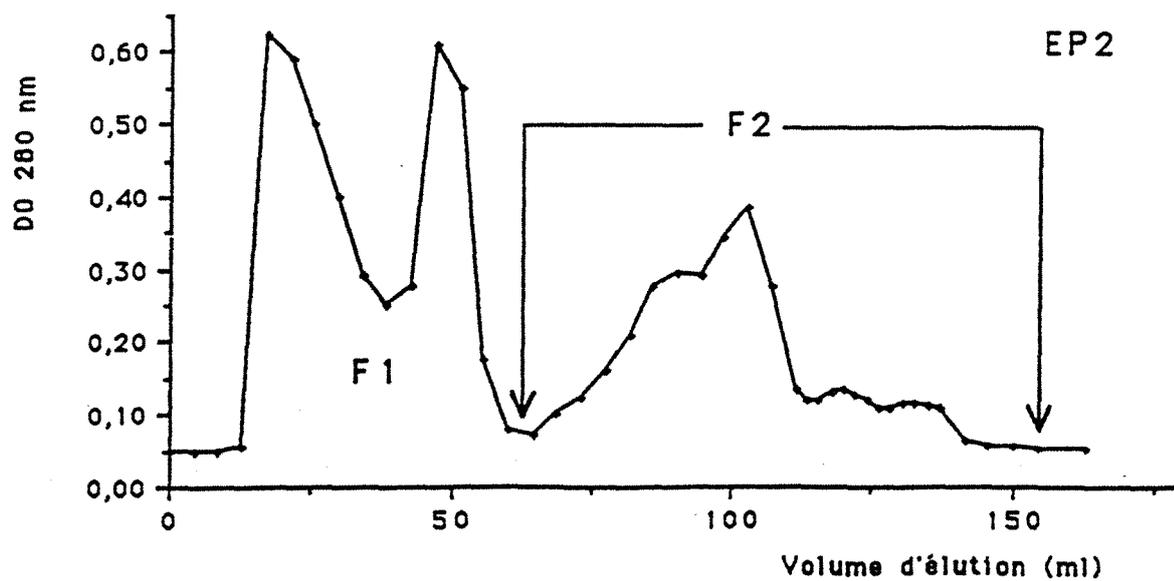
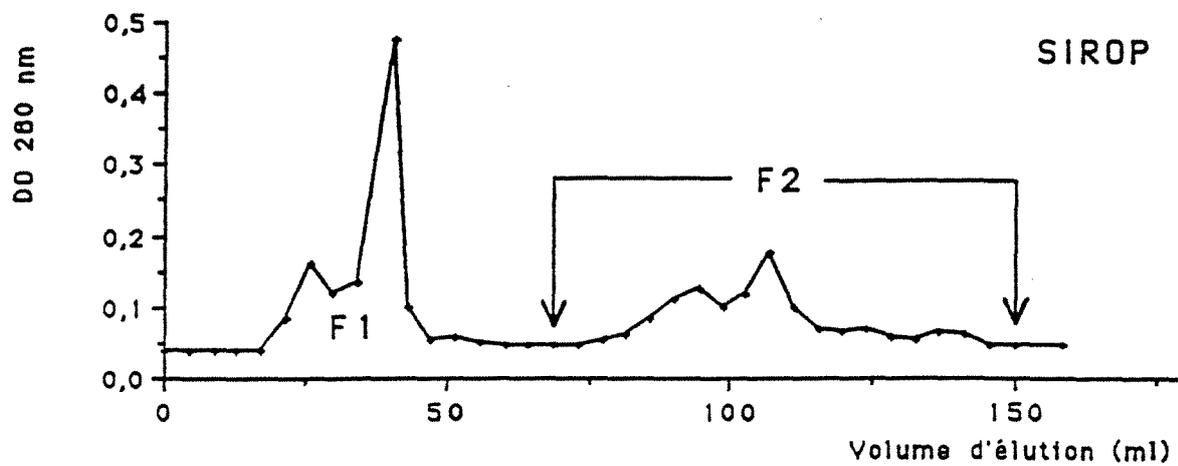


Figure 32: Fractionnement sur gel de Trisacryl GF.05 d'un sirop et d'un EP2 d'Appeldorn (Allemagne) Dépot: 1g d'échantillon à 70 brix. Elution: Eau 30ml:heure

Échantil lons		Matières sèches % (p/p)	Fraction F1 %(p/p) Macromolécules	Fraction F2 % "sucre" (p/p)	Rapport F1/F2
Epeville (A)	Sirop	69,40	4,10	95,90	0,04
	EP2	70,20	13,50	86,50	0,16
	S.R.*	98,86	2,00	98,00	0,02
Nakskov (B)	Sirop	66,49	2,98	97,02	0,03
	EP2	71,00	13,10	86,90	0,15
	S.R.*	98,64	0,30	99,70	0,003
Saxkopig (C)	Sirop	55,44	4,50	95,50	0,05
	EP2	67,08	10,90	89,10	0,12
	S.R.*	98,03	0,52	99,48	0,005
Appeldorn (D)	Sirop	74,32	8,20	91,80	0,09
	EP2	82,09	17,80	82,20	0,22

* S.R. = Sucre roux

Tableau 4: Résultats des séparations sur colonne Trisacryl GF O5 des échantillons Epeville, Nakskov, Saxkopig et Appeldorn

On constate que les résultats relatifs aux sucres roux font état d'une teneur peu importante en macromolécules. Il faut souligner cependant que le sucre roux de A, contient à peu près six fois plus de macromolécules que le sucre roux danois (2% pour A, 0,3% pour B et 0,5% pour C).

L'étude de ce tableau met bien en évidence les différences de composition entre produits danois et ceux d'Epeville. La teneur en macromolécules des produits français est légèrement plus élevée, cette différence est surtout sensible sur les sucres roux.

Les teneurs en macromolécules obtenues lors de cette manipulation sont trop élevées, il semble certain que l'élimination du saccharose n'a pas été totale, toutefois toutes les manipulations ayant été

réalisées de façons similaires, on peut penser que les différences observées sont significatives des différences réelles des quantités de macromolécules présentes.

VI.1.2. Etude du système triphasique à partir d'un EP2 d'Eppeville.

On s'aperçoit en effet que quand on dilue à l'eau distillée un EP2 d'Eppeville pour passer de 70 brix à 60 brix et ceci pour éviter simplement que l'échantillon ne prenne en masse, lors de la conservation à température ambiante, il arrive parfois que l'échantillon se déstabilise en trois phases distinctes:

- un surnageant liquide très coloré
- une phase intermédiaire blanchâtre
- une phase inférieure faite de petits cristaux noyés dans une gangue colorée.

Nous avons entrepris de vérifier si les compositions de ces trois phases étaient ou non identiques. L'étude comparative des trois phases issues de l'EP2 d'Eppeville (figure 33) montre que les macromolécules se concentrent davantage dans la phase supérieure ou surnageante. Ainsi on trouve dans cette dernière 21% de macromolécules (Tableau 5). En revanche la phase intermédiaire et la phase inférieure en contiennent 8,2% chacune. Ces résultats montrent donc une modification de la répartition des macromolécules de l'échantillon.

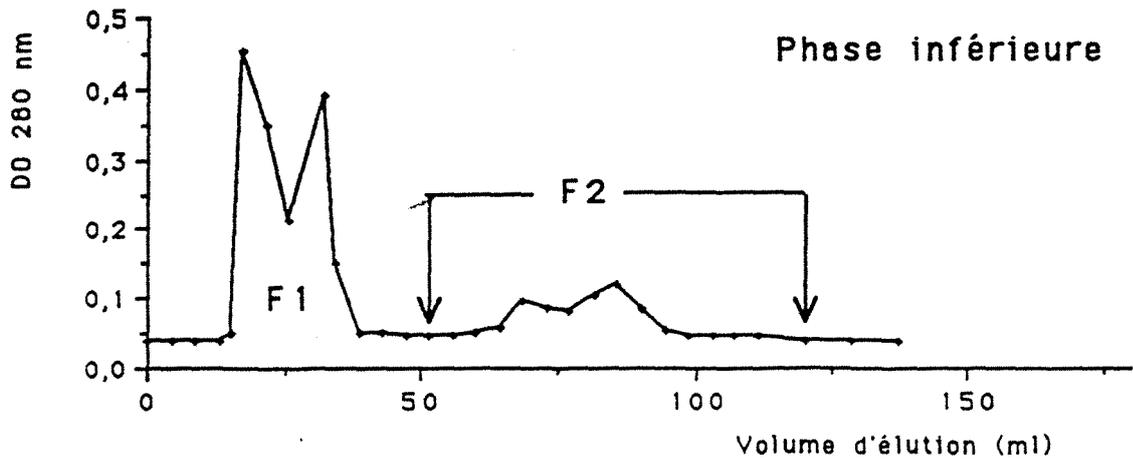
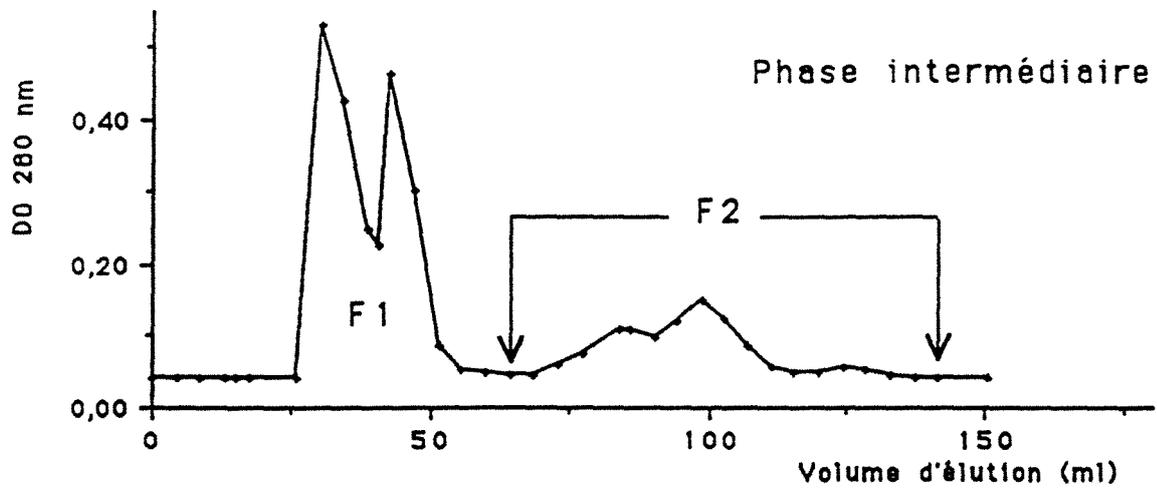
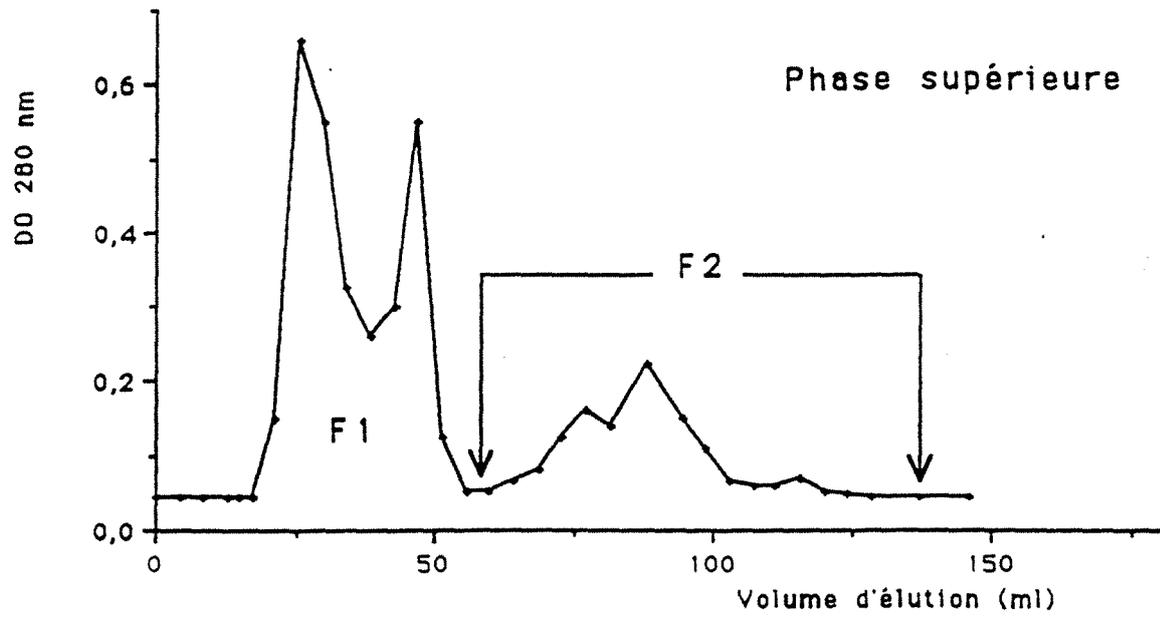


Figure 33: Fractionnement sur gel de Trisacryl GF 05 des trois phases de l'EP2 d'Eppeville
 Dépôt: 1g d'échantillon à 70 brix, Elution: Eau 30ml:heure

Echantillons	Matières sèches %(p/p)	Fraction F1 %(p/p) macromolécules	Fraction F2 % "sucre" (p/p)	Rapport F1/F2
Phase supérieure	72,14	21,00	79,00	0,27
Phase intermédiaire	86,80	08,20	91,80	0,09
Phase inférieure	88,20	08,20	91,80	0,09

Tableau 5: Résultats concernant le fractionnement sur colonne Trisacryl GF.05 des trois phases d'un EP2 d'Eppeville

VI.2. Analyse des fractions F1 par chromatographie d'échange d'ions

De nombreuses séparations de constituants glucidiques ont été proposées en utilisant comme phase stationnaire des résines échangeuses d'ions, ainsi Kawamoto et col. (1983) emploient une résine échangeuse de cations sous forme Na^+ pour séparer un mélange de mono, di et trisaccharides. Baker et col. (1986) ont eux aussi utilisé la chromatographie échangeuse d'ions pour séparer les sucres anomères α et β formés au cours du mécanisme de mutarotation

Dans le but de déterminer la proportion des macromolécules chargées et les macromolécules non chargées, nous nous sommes intéressés

à la première fraction (F₁) (constituée en majorité de macromolécules) issue de la séparation réalisées sur colonne de Trisacryl GF.O5.

Les macromolécules (F₁) sont séparées sur colonne de DEAE Sepharose CL.6B (colonne de 6cm sur 1,2cm de diamètre interne) équilibrée à l'aide du tampon phosphate 0,05M pH 4,8. selon le protocole décrit précédemment.

VI.2.1. Répartition des macromolécules des fractions F₁ provenant des sirops, EP2 et sucre roux d'Eppeville,danois et allemands.

Cette étude a porté sur les fractions F₁ obtenues par chromatographie sur Trisacryl GF 05. Les profils d'élution correspondants sont représentés sur les figures 34, 35, 36 et 37.

Par intégration des surfaces des pics ainsi obtenus, on détermine les proportions des macromolécules non chargées (NC) et chargées (C) .Ces résultats sont regroupés dans le tableau 6.

Nous constatons que tous les échantillons contiennent davantage de macromolécules chargées que de macromolécules non chargées, exception faite de l'échantillon d'Appeldorn pour lequel le sirop et l'EP2 présentent au contraire une teneur en macromolécules non chargées supérieure à celle des macromolécules chargées. Tous les sirops présentent donc un rapport fraction chargée sur fraction non chargée (C/NC) légèrement supérieur à 1, alors que dans le cas d'Appeldorn ce rapport est égal à 0,8. De même pour les EP2, le rapport C/NC est de l'ordre de 1,6 à 1,8 (le rapport C/NC pour Appeldorn étant de 0,95).

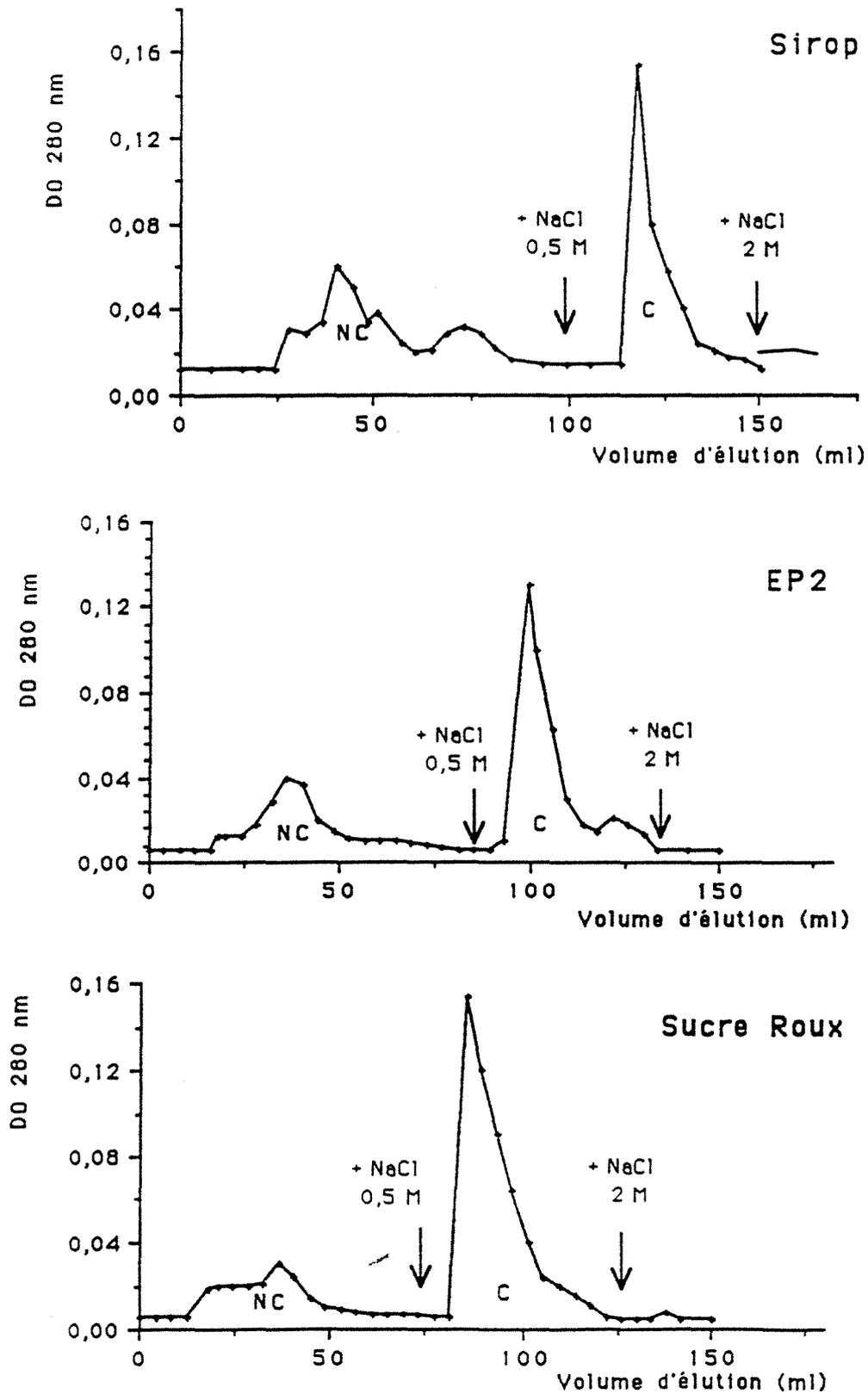


Figure 34: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des fractions F1 issus de passage sur Trisacryl GF 05 d'un sirop, d'un EP2 et d'un sucre roux d'Eppeville. Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

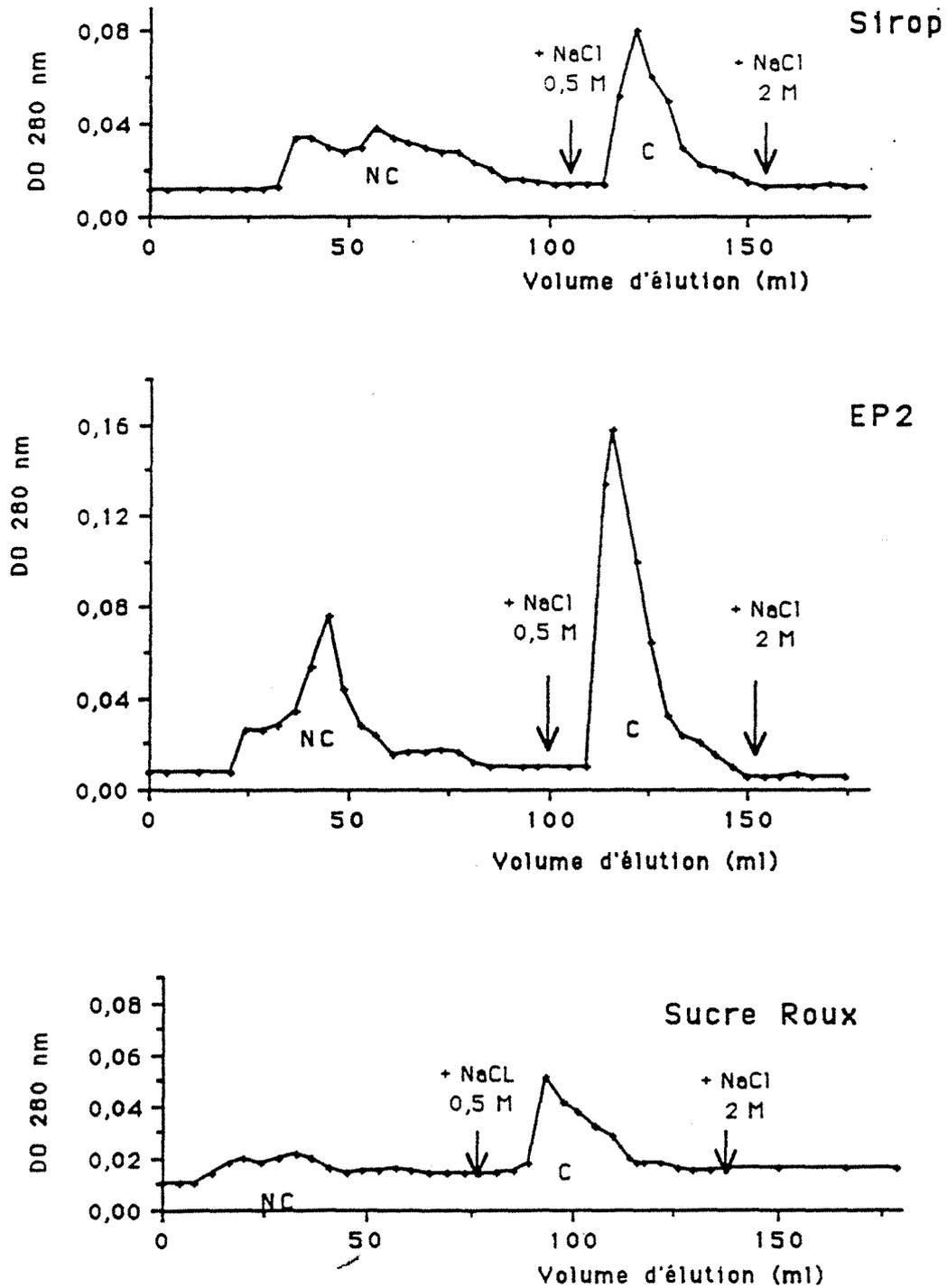


Figure 35: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des fractions F1 issus de passage sur Trisacryl GF 05 d'un sirop, d'un EP2 et d'un sucre roux de Nakskov (Danemark). Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

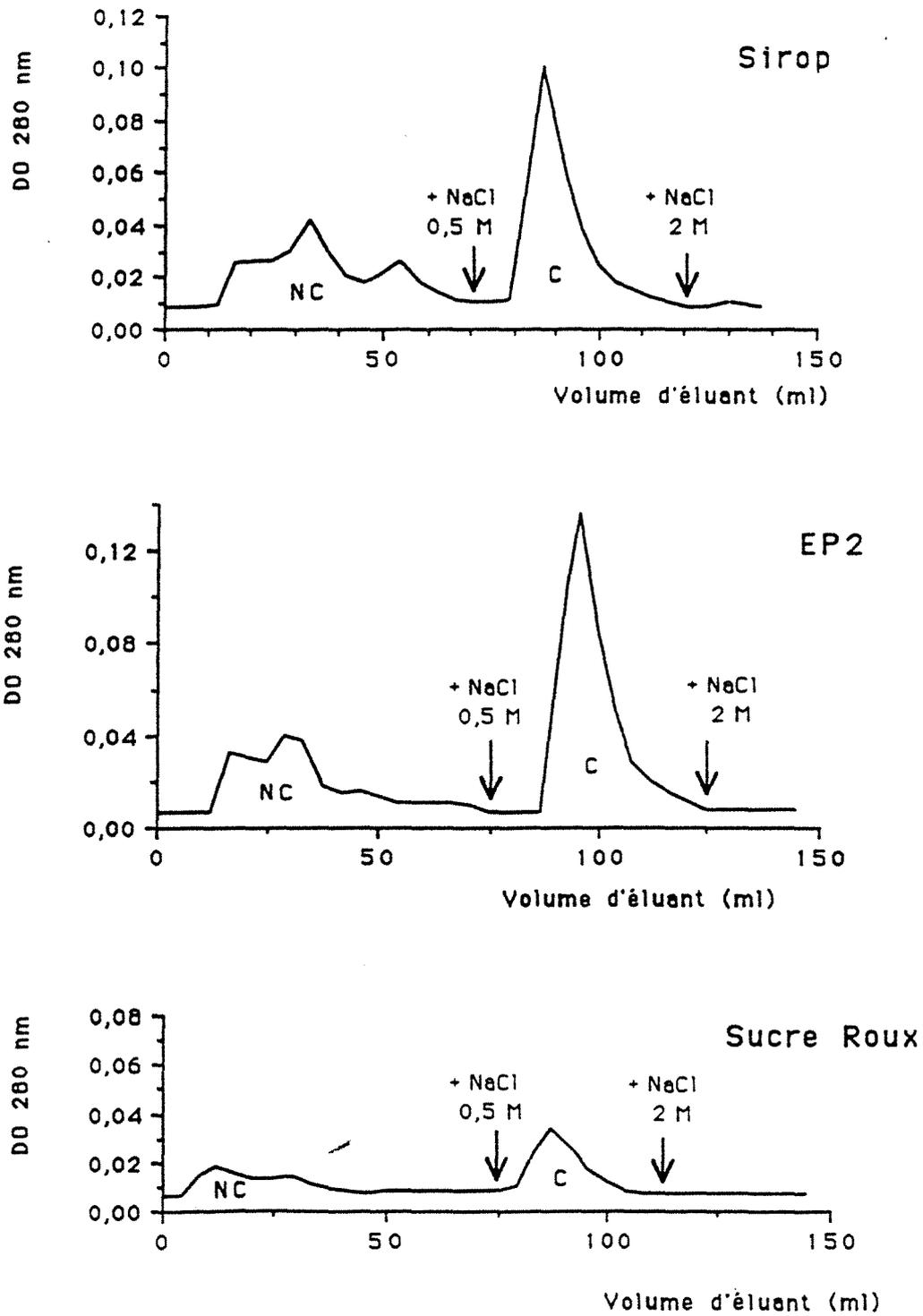


Figure 36: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des fractions F1 issus de passage sur Trisacryl GF 05 d'un sirop, d'un EP2 et d'un sucre roux de Saxköpig (Danemark). Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

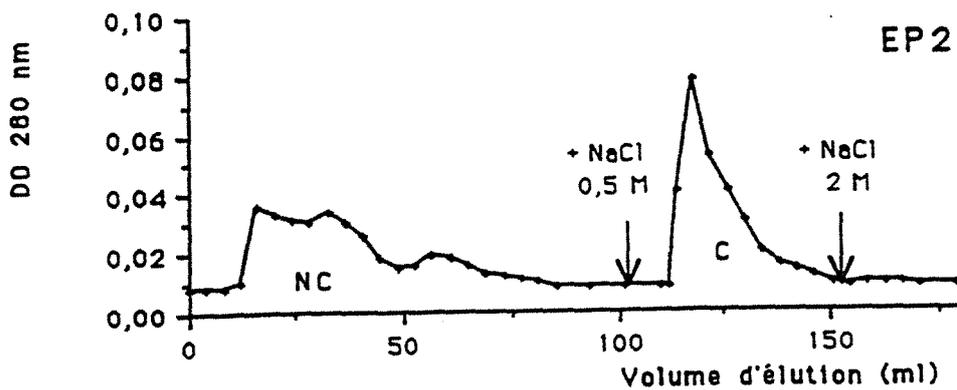
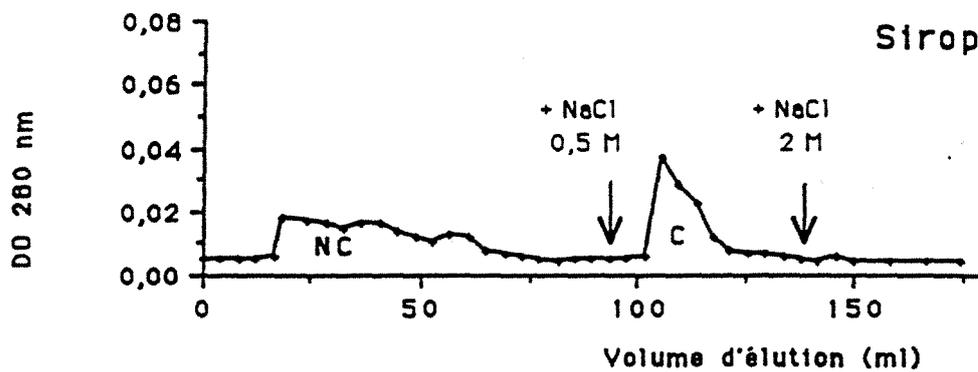


Figure 37: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des fractions F1 issus de passage sur Trisacryl GF 05 d'un sirop et d'un EP2 d'Appeldorn (Allemagne). Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

Echantillons		Macromolécules chargées(C) (% de F1)	Macromolécules non chargées(NC) (% de F1)	Rapport C/NC
Epeville	Sirop	51,20	48,80	1,05
	EP2	64,70	35,30	1,83
	Sucre roux	74,40	25,60	2,91
Nakskov	Sirop	50,00	50,00	1,00
	EP2	51,30	38,70	1,58
	Sucre roux	65,20	34,80	1,87
Saxkopig	Sirop	53,90	46,10	1,17
	EP2	64,00	36,00	1,78
	Sucre roux	62,00	37,10	1,69
Appeldorn	Sirop	44,40	55,60	0,80
	EP2	48,50	51,50	0,94

Tableau 6: Résultats de la chromatographie sur colonne de DEAE Sepharose CL 6B des échantillons d'Epeville, Nakskov, Saxkopig et Appeldorn

Ces résultats confirment les résultats précédents et tendent à montrer que dans le cas des produits provenant d'Epeville la fraction chargée est toujours plus importante que pour les échantillons danois. On note encore que pour tous les échantillons le rapport C/NC augmente quand on passe du sirop à l'EP2 puis au sucre roux correspondant. Le rapport C/NC des sucres roux varie de 1,8 (danois) à 3,0 (Epeville). Il semble d'ailleurs que le rapport C/NC soit pour un échantillon un indice de sa qualité et que plus ce rapport est élevé et plus l'échantillon est dégradé.

VI.2.2 Répartition des macromolécules des fractions F₁ issues de la chromatographie sur Trisacryl des trois phases d'un système triphasique obtenu par dilution d'un EP2 d'Eppeville

Les résultats du fractionnement sur DEAE Sepharose CL 6B montrent (Figure 38 et Tableau 7) que la phase intermédiaire présente le pourcentage le plus élevé de macromolécules non chargées; autrement dit le rapport macromolécules chargées (C) sur macromolécules non chargées (NC) (C/NC) de cette phase est le plus faible des trois. Nous avons vu précédemment que c'est dans la phase surnageante que les macromolécules sont le plus fortement concentrées; il semble donc qu'il soit nécessaire de ne pas assimiler macromolécules et substances chargées, les macromolécules peuvent être chargées ou non et leur comportement est certainement lié à leur charge.

	Macromolécules chargées (C) (% de F ₁)	Macromolécules non chargées (NC) (% de F ₁)	Rapport C/NC
Phase supérieure	67,40	32,60	2,07
Phase intermédiaire	64,30	35,70	1,80
Phase inférieure	67,40	32,60	2,07

Tableau 7: Résultats de la chromatographie sur colonne de DEAE Sepharose CL.6B des fractions F₁ d'un système triphasique d'EP2 d'Eppeville

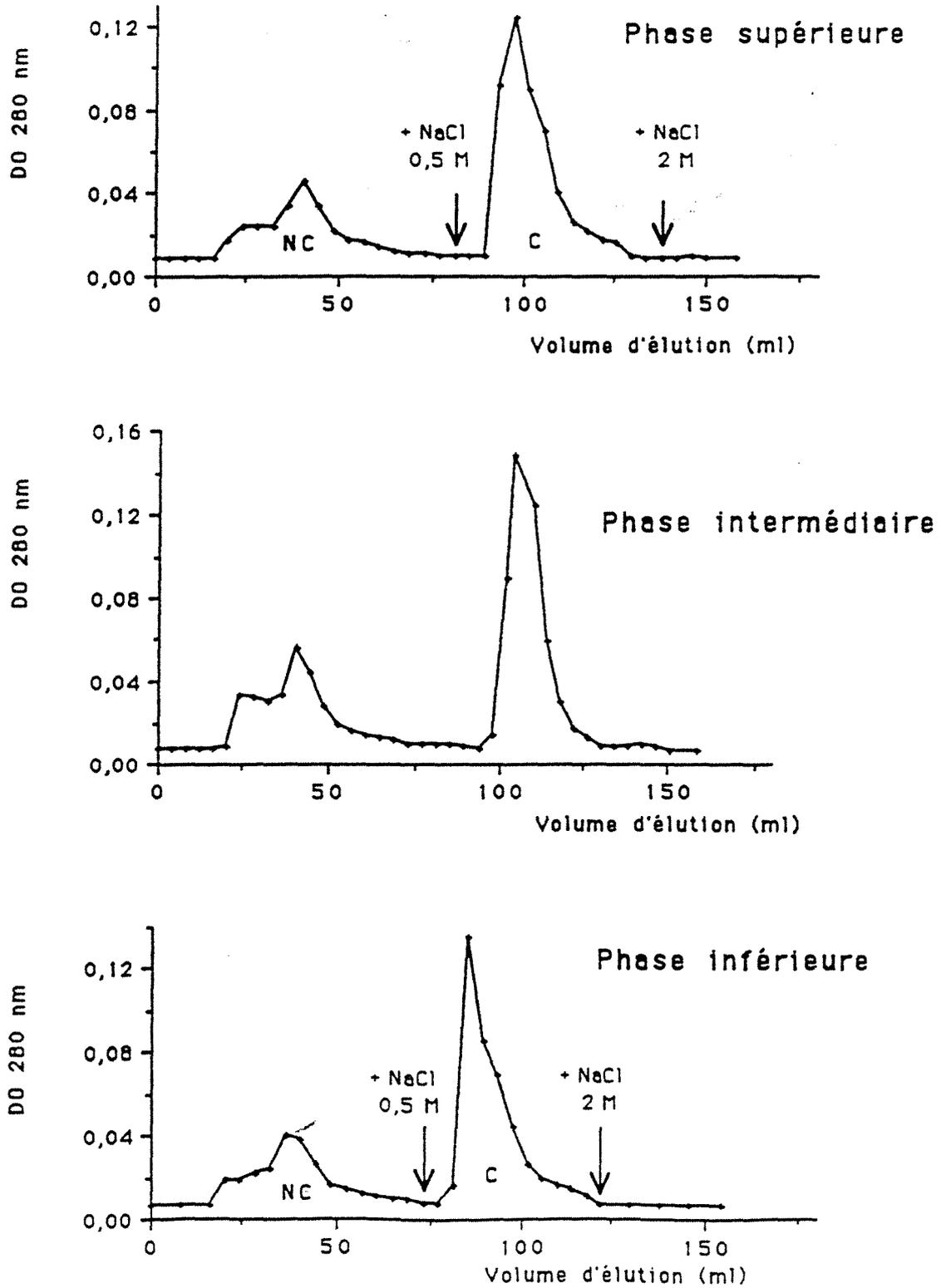


Figure 38: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des fractions F1 issus de passage sur Trisacryl GF 05 des trois phases issues du système triphasique d'un EP2 d'Eppeville. Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

VII. Isolement des substances colorées présentes dans un EP2 d'Eppeville sur cartouche apolaire Sep pak C18

Les résultats précédents ont montré qu'au fur et à mesure qu'on avance dans le process, plus les produits se dégradent. Au cours des différentes étapes de cristallisations les eaux mères sont de plus en plus colorées, les sucres également. Aussi depuis très longtemps les différents auteurs qui se sont penchés sur ce problème ont souvent mis en cause les colorants, pigments bruns provenant de réactions de brunissement non enzymatique dont l'origine est la dégradation thermique du saccharose en acides carboxyliques divers, en sucres réducteurs qui se condensent avec les acides aminés provenant de l'hydrolyse des protéines.

Il était donc intéressant de rechercher le rôle que jouent réellement les pigments.

Nomura et col. (1984) ont tenté d'extraire les matières colorantes contenues dans les jus et la mélasse de canne à sucre par passage sur une colonne de silice gréffée octadécyle Sep pak C18 afin d'en éliminer les substances gênantes avant séparation du mélange de glucose, fructose et saccharose.

Il nous a donc paru nécessaire de procéder au même fractionnement et à l'isolement de la fraction colorée (pigments) pour d'une part étudier son influence sur la précipitation du sucre raffiné (voir chapitre suivant) et en même temps pour déterminer la proportion des substances chargées et non chargées constituant les pigments.

Dans cette étude nous nous sommes limités à l'étude des pigments des EP2 d'Eppeville et danois.

Les EP2 sont dilués au demi, à l'eau distillée, avant d'être ramenés à pH7 avec HCl 1N. Le mélange (50 ml) est passé sur une cartouche C18 (Sep Pak) (Waters). C'est une cartouche garnie d'un support fortement hydrophobe; ce support retiendra préférentiellement les composés les plus

apolaires. Pour éliminer les espèces moléculaires non retenues dont le saccharose, on lave la cartouche avec de l'eau (50 ml). Les pigments retenus sur la cartouche sont élués à l'aide d'un mélange éthanol/eau (5/3, v/v).

VII.1. Elution de la fraction colorée sur échangeuse d'ions.

Les pigments isolés sur Sep Pak C18 sont chromatographiés sur colonne de DEAE Sepharose CL.6B. On peut noter d'après le profil d'éluion des pigments des deux EP2 (Epeville et danois) (figure 39) que ces pigments sont constitués à la fois de molécules chargées et de molécules non chargées; on a donc déterminé le rapport C/NC qui est de 0,61 pour les pigments de l'EP2 de Naskov et de 0,69 dans le cas de l'EP2 d'Epeville. Notons que ces rapports sont inférieurs à 1 dans les deux cas, ce qui veut dire qu'il y a relativement plus de molécules non chargées que de molécules chargées. Il faut préciser que ces rapports sont faibles par rapport macromolécules chargées/macromolécules non chargées des mêmes échantillons et même de l'ensemble des résultats des tableaux 6 et 7

Ceci nous permet de montrer que les pigments contiennent environ 1,5 fois plus de molécules non chargées que de molécules chargées dans les conditions expérimentales retenues. Ce résultat nous amène à penser que les macromolécules débarrassées des pigments doivent être en grande partie chargées.

VII.2. Caractérisation de la fraction non retenue par la cartouche C18 Sep Pak

Compte tenu de l'ensemble des observations précédentes et en vue de les vérifier, nous avons jugé intéressant d'étudier la fraction non retenue par la cartouche Sep Pak.

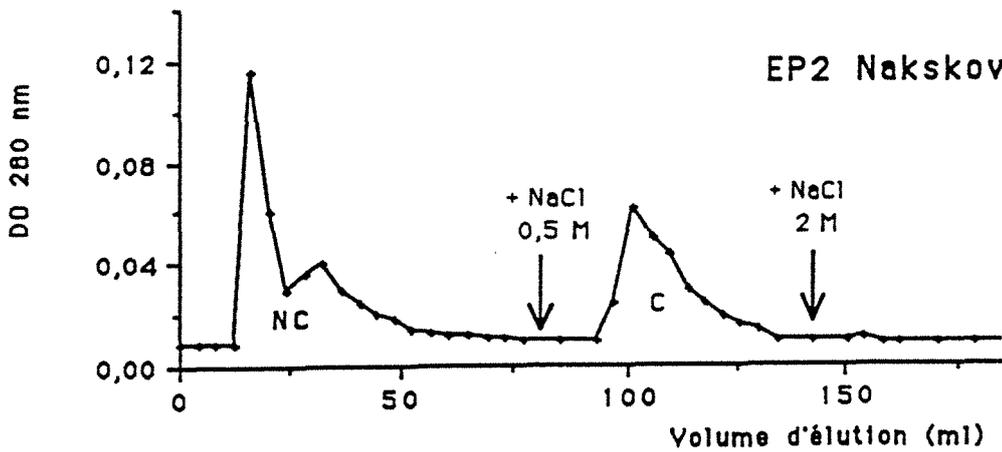
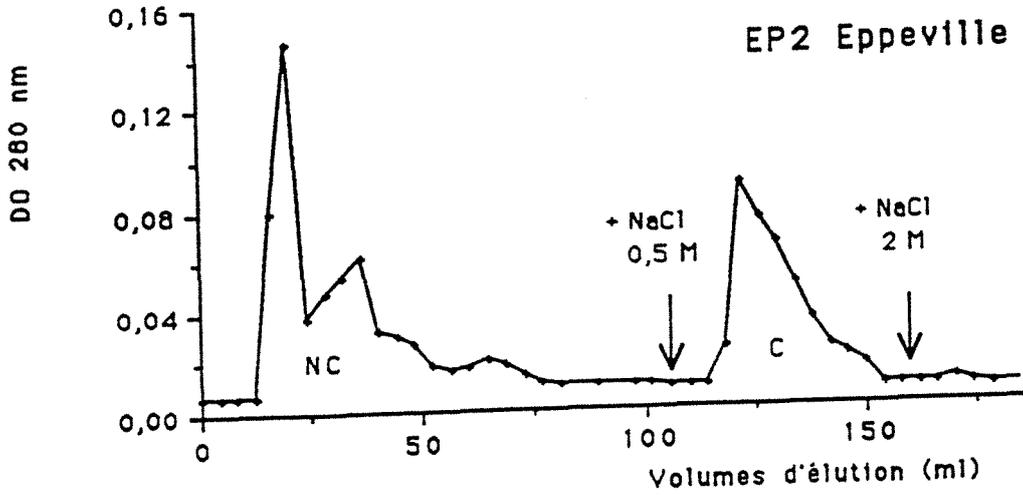


Figure 39: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des pigments des EP2 d'Eppeville et de Nakskov retenus sur Sep-pak C18. Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

Cette fraction n'est pratiquement pas colorée. Cette fraction est passée sur gel de Trisacryl GF.05 pour nous permettre de récupérer la fraction F₁ riche en macromolécules (la fraction F₂ contient les petites molécules: saccharose et sels,...). La fraction F₁ est à son tour chromatographiée sur résine échangeuse d'ions (DEAE Sépharose CL.6B) afin de calculer les rapports C/NC relatifs aux EP2 d'Eppeville et de Nakskov dépourvus de leurs pigments.

D'après les profils d'élution de la figure 40 on confirme les résultats du paragraphe précédent: les rapports C/NC sont respectivement de 6,7 et 8,1 respectivement pour les macromolécules (non colorées) de l'EP2 d'Eppeville et de l'EP2 de Nakskov, ce qui montre qu'après élimination des pigments sur Sep Pak, les macromolécules restantes non colorées sont essentiellement des composés chargés.

D'autre part la quantité de macromolécules chargées (non pigments) est plus importante dans le cas de l'EP2 d'Eppeville que la quantité de macromolécules chargées (non pigments) de l'EP2 de Nakskov. ($C_{Epp}/C_{Ns}=1,4$), ce résultat concorde bien avec les résultats obtenus lors du fractionnement global de ces EP2.

VIII. Influence des recyclages au cours du process

Afin d'éviter le plus possible les pertes en saccharose, on a toujours eu tendance à multiplier les recyclages (égouts riches ou pauvres, refontes,...) en les mélangeant à des produits vierges. Le tableau 8 montre, selon Rousseau (1990) l'influence de ces recyclages sur la qualité d'une lignée de produits issus d'un même sirop.

L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure que tout recyclage de produits ayant déjà subi une cristallisation, et même le sucre raffiné (gain de pureté de la masse cuite: +2,2) est néfaste à la qualité du sucre (gain en pts CEE: - 0,3 point).

Produit	Masse cuite		Sucre produit			
	Pureté	coloration	Pts aspect	Pts coloration	Pts cendres	Pts CEE
Sirop Roye	92,9	1780	1,0	1,6	4,4	7,0
Sirop Roye + ER1	94,7	2258	1,5	2,3	4,5	8,3
Sirop Roye +refonte	94,7	2004	1,0	1,8	4,03	7,1
Sirop Roye + sucre raffiné	95,1	1332	1,0	1,6	4,1	6,7
Sirop Roye + s. roux Roye	95,0	1609	2,0	2,8	4,8	9,6
Sirop Roye + sucre roux d'Eppeville	94,3	1926	2,0	2,3	4,2	8,5

ER1: Egouts riches du premier jet

Tableau 8: Résultats technologiques de recyclage au cours du process.

De même le fait de recycler du sucre roux permet de gagner en pureté, ce qui entraîne une diminution des cendres mais une augmentation des points totaux CEE du sucre produit malgré une coloration de masse cuite presque constante. Le tableau 9 et la figure 41 rapportent ces résultats.

Produit	Masse cuite		Sucre produit			
	Pureté	coloration	Pts aspect	Pts coloration	Pts cendres	Pts CEE
Sirop Roye	92,8	1840	1,0	1,5	4,4	6,9
Sirop Roye	94,5	2052	4,0	3,1	3,7	10,8
+ sucre roux	95,5	2034	5,0	4,1	3,6	12,6
Sucre roux	96,7	2070	6,0	4,9	2,8	13,7

Tableau 9 Résultats technologiques de recyclage de sucre roux de Roye dans du sirop vierge de Roye.

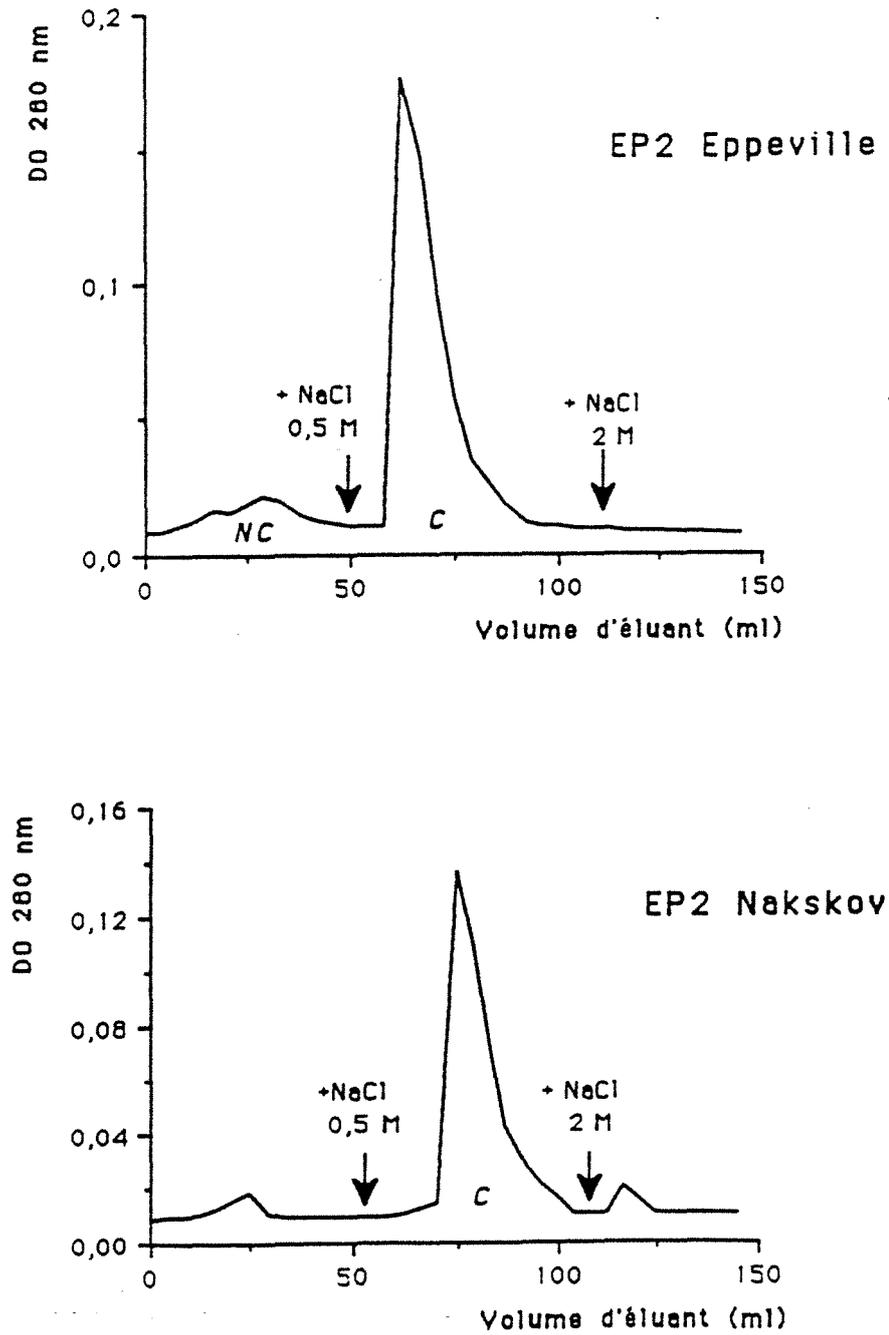


Figure 40: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B des macromolécules des EP2 d'Eppeville et de Nakskov: après élimination des pigments sur Sep-pak C18. Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 2M

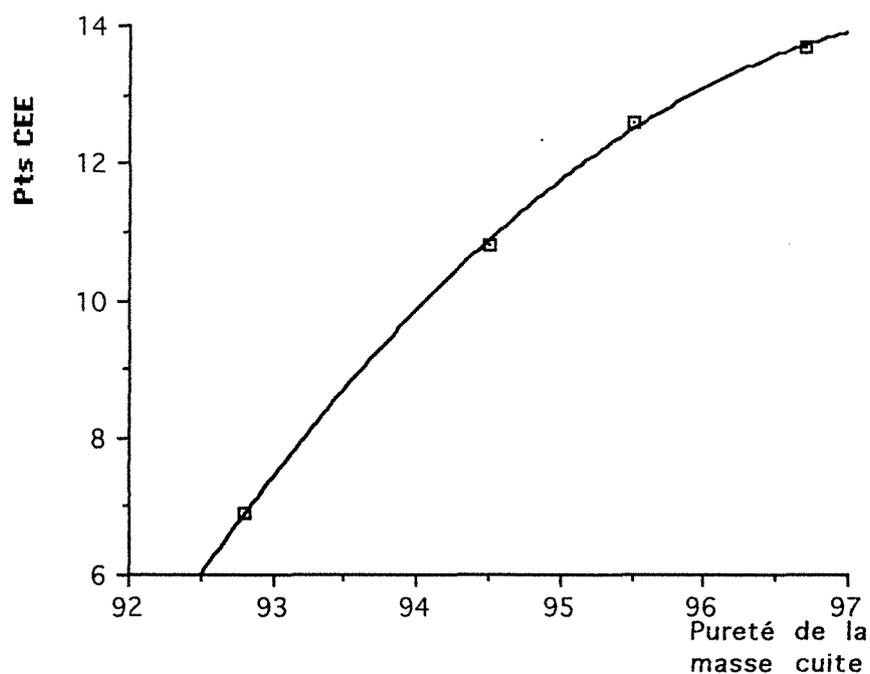


Figure41: Relation entre la pureté de la masse cuite et les points CEE du sucre blanc produit en fonction de la quantité de sucre roux recyclé dans le sirop vierge.

Contrairement à ce qu'on aurait pu penser, on observe qu'il existe entre la pureté de la masse cuite et les points CEE du sucre produit une régression non linéaire avec un très bon coefficient de corrélation. Tout se passe comme si malgré l'augmentation de la pureté, on assistait à une diminution rapide de la qualité du sucre.

Ce phénomène est en soit assez surprenant et nous avons voulu vérifier si cette dégradation de la qualité s'accompagnait d'une augmentation de la proportion des macromolécules chargées. Des échantillons identiques ont été chromatographiés sur résine DEAE Sépharose CL 6B. La figure 42 le tableau 10 rapportent ces résultats. Ils confirment bien ce que nous pouvions en attendre. En effet on assiste à l'augmentation de la fraction des macromolécules chargées quand on enrichit le sirop vierge initial en sucre roux

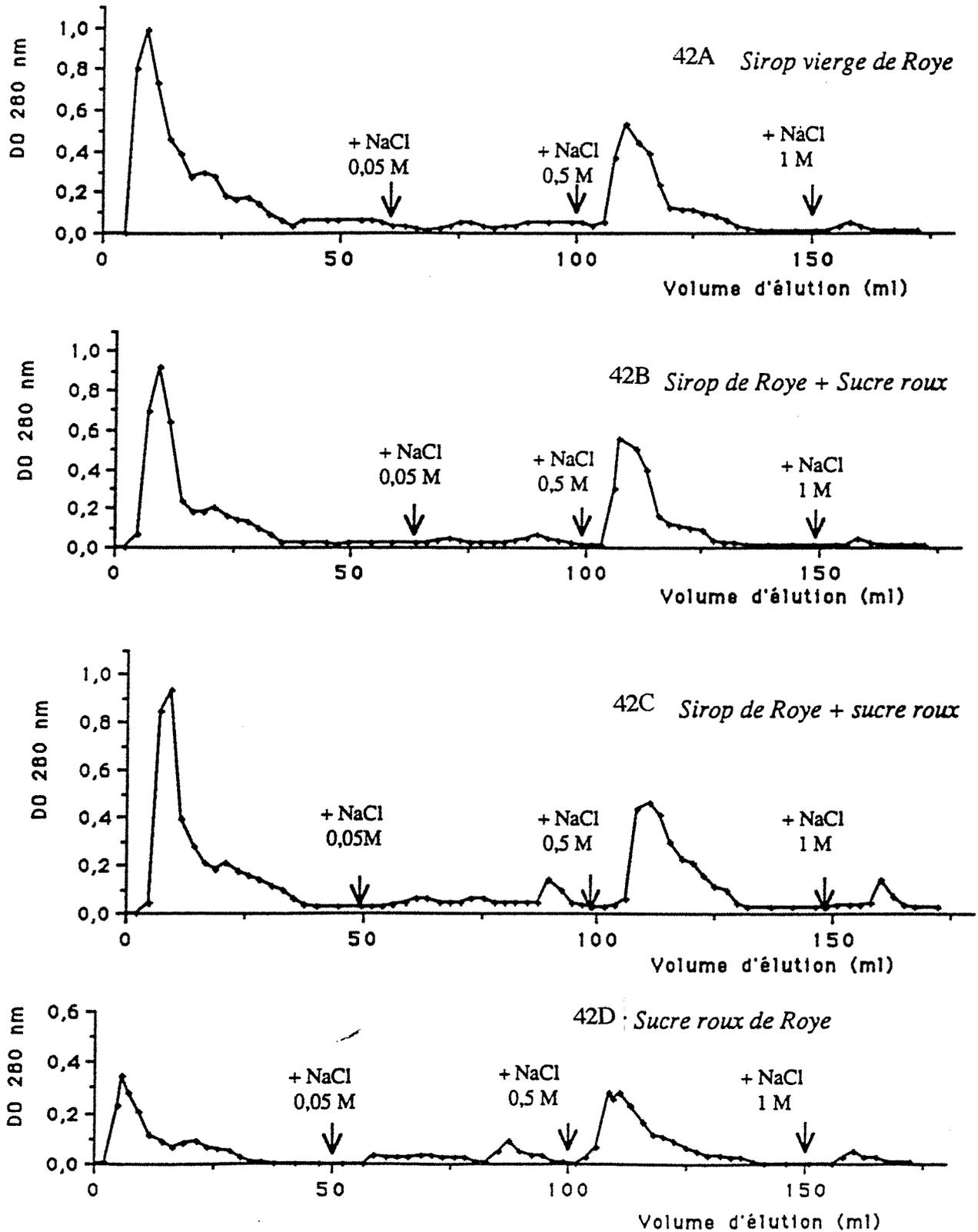


Figure 42: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL 6B d'un sirop vierge de Roye et du même sirop additionné de sucre roux en quantité croissante (42B et 42C) et d'une solution de sucre roux. (Tableau 9). Eluant: Tampon phosphate 0,05M et pH 4,8; puis le même tampon est additionné de NaCl 0,5M puis de NaCl 1M.

N° figure	Brix	% sucre	pureté	% non- sucres	% NC	% C	Rapport C/NC
42-A	70,0	64,86	92,7	5,14	64,4	35,6	0,55
42-B	69,7	66,58	95,5	3,12	56,8	43,2	0,76
42-C	69,8	67,41	96,6	2,39	50,3	49,7	0,99
42-D	70,0		98,2		41,6	58,4	1,40

42-A : Sirop de Roye

42-B : Sirop de Roye + sucre roux

42-C : Sirop de Roye + sucre roux

42-D : Sucre roux

% NC : % macromolécules non chargées

% C : % macromolécules chargées

Tableau 10 : Evolution de la teneur en macromolécules chargées et non chargées en fonction de la quantité de sucre roux ajouté au sirop vierge de Roye.

Ces résultats tendent donc à confirmer ce qu'avaient déjà souligné les tests technologiques; plus on recycle, plus on risque d'altérer la stabilité colloïdale et la qualité des sirops malgré l'accroissement de plusieurs points de la pureté de départ.

IX Etude de la dégradation thermique d'une solution de saccharose

Afin de vérifier l'effet de la caramélisation du saccharose sur l'obtention de macromolécules, nous avons étudié la dégradation thermique d'une solution à 70 brix d'un sucre de betterave de 1^{er} jet. Afin de nous rapprocher du process, nous avons artificiellement réglé le pH de notre solution à 9,4 à l'aide de NaOH 1N.

Les solutions sont ensuite portées à 120°C dans un autoclave en chaleur humide pendant des temps variables allant de 1 à 4 heures. A la sortie de l'autoclave les solutions sont refroidies, le pH est mesuré (figure 43) et un échantillon correspondant à chaque durée de traitement est chromatographié sur DEAE Sépharose CL 6B.(Figure 43)

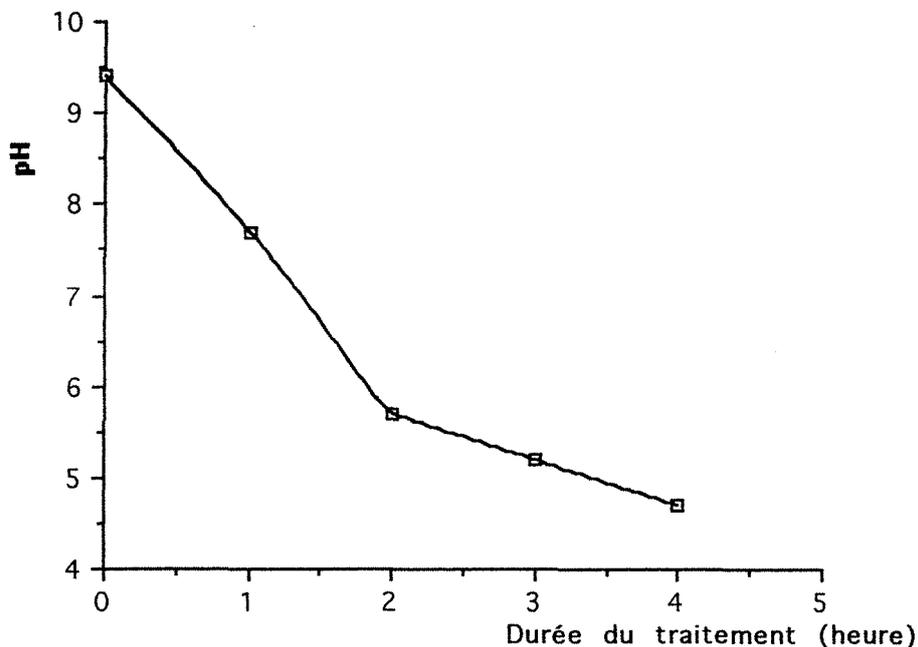


Figure 43: Evolution du pH au cours de la dégradation thermique du saccharose

La dégradation thermique du saccharose s'accompagne donc d'une baisse importante du pH, de nombreux acides peuvent en effet se former, acidifiant fortement le milieu malgré le pH élevé de départ.

La figure 44 montre d'ailleurs que la plus grande partie des produits formés ne sont pas chargés, dans les conditions de l'expérience. On note cependant la formation d'une petite quantité de substances chargées qui, compte tenu de la longueur d'onde de détection (280 nm) ne sont pas de simple acide carboxylique.

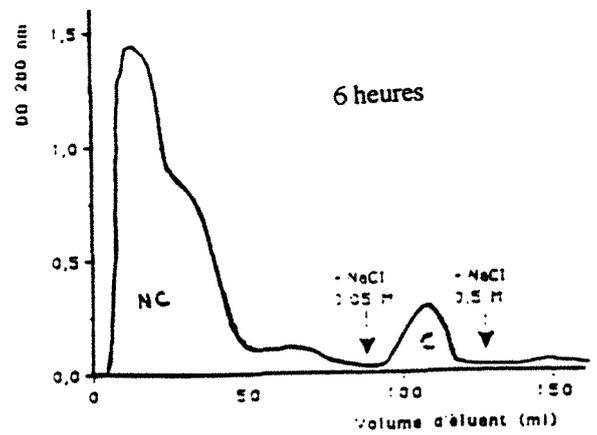
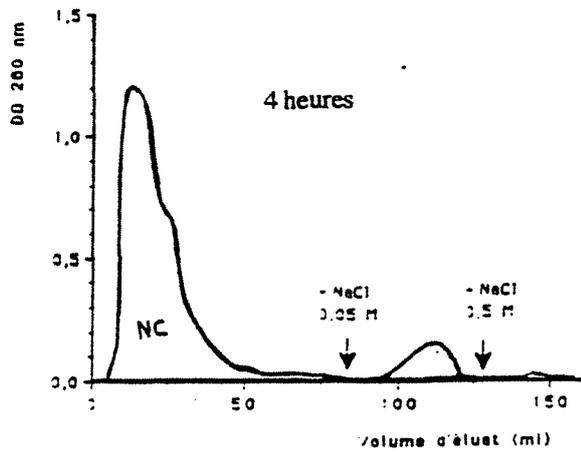
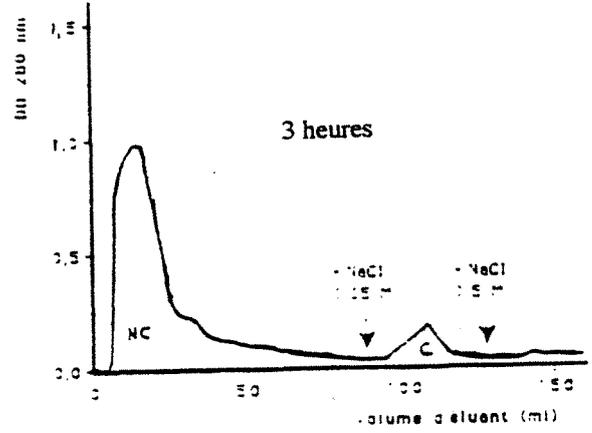
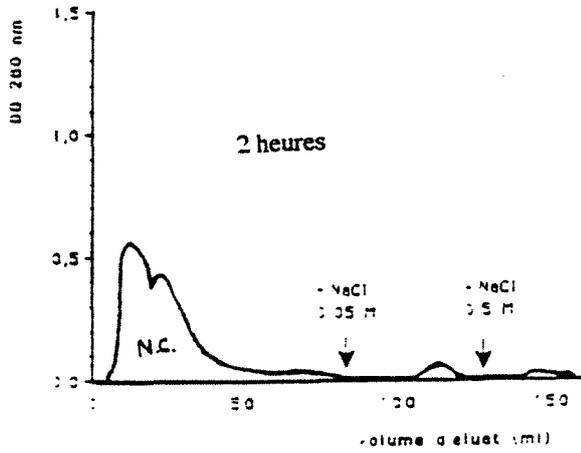


Figure 44: Chromatographie sur DEAE Sepharose CL CB d'une solution de saccharose ayant subi un traitement thermique de 2, 3, 4 et 6 heures

La dégradation thermique du saccharose ne semble donc pas être la cause essentielle de l'apparition des macromolécules chargées au cours du process. Il nous semble plus judicieux d'orienter nos recherches vers la dégradation de certaines structures macromoléculaires provenant de la betterave et qui subissent des modifications parfois importantes au cours du process. Ce travail fait actuellement l'objet au laboratoire d'une autre thèse.

X. Analyse chimique de certains composés isolés

Afin de connaître la nature des fractions de poids moléculaires élevés, nous avons dialysé certains échantillons et nous avons recherché la nature chimique des adialysats obtenus. Le tableau 11 rassemble les résultats obtenus.

Echantillon	Résidu après dialyse (mg pour 100g)	Saponines après hydrolyse (% résidu sec)	Sucres totaux après hydrolyse (% du résidu sec)	Phénols	Protéines =N Kjeldahl x 6,25	Cendres
EP2 danois	600	19,5	23,6	0,23	26,3	12,8
EP2 Eppeville	500	13	25,1	0,18	20,3	8
Précipité EP2 Eppeville	1018	15,5	25,1	0,6	15,6	9,35
Surnageant EP2 Eppeville	436	15,2	19,5	0,6	20,9	14,3

Tableau 11: Analyse chimique de certains composés isolés

On remarquera que les compositions globales des différents échantillons étudiés ne présentent pas de grandes variations.

Les saponines sont en quantités non négligeables (15 à 20%), mais elles sont plus abondantes dans l'EP2 danois qui ne présente pas de problème particulier de cristallisation.

Les teneurs en sucres totaux sont de l'ordre de 20 à 25% du résidu sec après dialyse. Le résidu de dialyse est hydrolysé. Les produits d'hydrolyse ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne en verre garnie d'OV1 à 1% sur chromosorb WAW 80-100 mesh, après silylation selon la méthode proposée par Goodenough et col. (1982). (Voir chapitre matériel et méthodes). Le tableau 12 donne les résultats de cette analyse

	Arabinose	Rhamnose	Galactose	Glucose	Mannose	Fucose	Fructose
EP2 Epeville	17,70	21,30	15,20	15,10	21,90	02,60	05,80
EP2 Danois	21,80	24,00	12,30	17,70	16,40	02,80	04,70
Précipité d'EP2 Epeville	05,90	07,70	06,20	65,70	08,00	03,10	03,10
Surnagean t d'EP2 Epeville	16,00	17,50	14,10	23,10	13,10	02,80	07,50

Tableau 12: Chromatographie en phase gazeuse des sucres des résidus d'EP2
après dialyse

Dans ces conditions, nous avons pu identifier les sucres simples suivants: arabinose, rhamnose, galactose, glucose, mannose, fructose et

fructose. Les teneurs en sucres simples ne sont pas très différentes les unes des autres. On remarquera cependant que le rapport arabinose / galactose est égal à 1,8 dans le cas de l'EP2 danois, il n'est que de 1,2 dans le cas de l'EP2 d'Eppeville. Il sera donc important de vérifier si cette différence correspond en fait à une différence de structure.

Le précipité de l'EP2 analysé contenait une très grande quantité de glucose, on pourrait donc penser à des glucanes dont la structure reste à établir.

Les autres constituants analysés sont d'importance variable.

Les phénols sont présents en faibles quantités (< 1%). Cette faible teneur fait qu'ils ne doivent pas avoir une très grande importance. Cependant leur grande oxydabilité et leur réactivité avec les protéines peut contribuer à la formation de complexes tanno-protéiques solubles et insolubles.

Les teneurs en protéines (N Kjeldhal x 6,25) ne sont pas négligeables, c'est dans le sirop danois que la teneur est la plus forte. Il ne faut pas oublier que si ces protéines sont hydrolysées au cours du process, elles fourniront des acides aminés qui pourront réagir avec les sucres réducteurs pour former des pigments bruns.

Le taux de cendres varie de 8 à 14%. Ce taux est plus important pour l'EP2 danois (environ 13%) que pour les EP2 troubles d'Eppeville (environ 8%). On remarque que c'est dans le surnageant dialysé de l'EP2 d'Eppeville que la partie minérale est la plus importante.

Il semble donc à priori que ce sont bien les sucres totaux qui diffèrent le plus d'un échantillon à l'autre.

Cette étude fait actuellement l'objet d'une autre thèse au laboratoire de l'Industrie Alimentaire de L'ENSAIA

XI. Conclusion.

L'étude comparative des différents échantillons industriels issus de différentes fabrications nécessite l'utilisation simultanée de plusieurs

techniques. La combinaison des méthodes de fractionnement sur colonne Trisacryl et échangeuse d'ions avec l'ultrafiltration et dialyse, nous a permis de dégager des différences très nettes d'autres beaucoup moins marquées. Ainsi, on a pu noter que l'EP2 Danois contient davantage de polyosides à caractère non chargé que l'EP2 Eppeville il s'agit de polyosides de poids moléculaire supérieur à 10000, car en revanche, les poids moléculaires compris entre 2000 et 10000 ne montrent pas de différences significatives.

Cette étude nous confirme que les résines de nouvelle déminéralisation retiennent efficacement les produits chargés. C'est produits sont normalement retenus sur colonne de DEAE Sepharose CL6B et élués par augmentation de la force ionique.

Ainsi on a pu observer que la teneur en macromolécules chargées était plus élevée pour les EP2 d'Eppeville que pour les EP2 Danois. D'autre part l'étude des systèmes triphasiques de l'EP2 d'Eppeville a montré une concentration plus élevée des macromolécules dans la phase surnageante.

La chromatographie d'exclusion stérique, la chromatographie d'échange d'ions et la séparation des pigments sur Sep Pak, nous a permis de penser que ces pigments sont essentiellement des molécules non chargées. Il s'agit surtout de molécules de faible poids moléculaire, ce qui confirme les résultats trouvés dernièrement par Menier, (1989), selon cet auteur il y a une fraction de faible poids moléculaire très colorée et une fraction de poids moléculaire très élevé non colorée ou très peu colorée, soupçonnée d'être responsable des phénomènes de turbidité rencontrée dans les solutions de sucre. Ces macromolécules seraient à rapprocher de la nature polysaccharidique des composés isolés dans les jus et les sirops par Vogel et col (1988).

La figure 45 résume le protocole suivi pour l'évaluation des macromolécules chargés et non chargés.

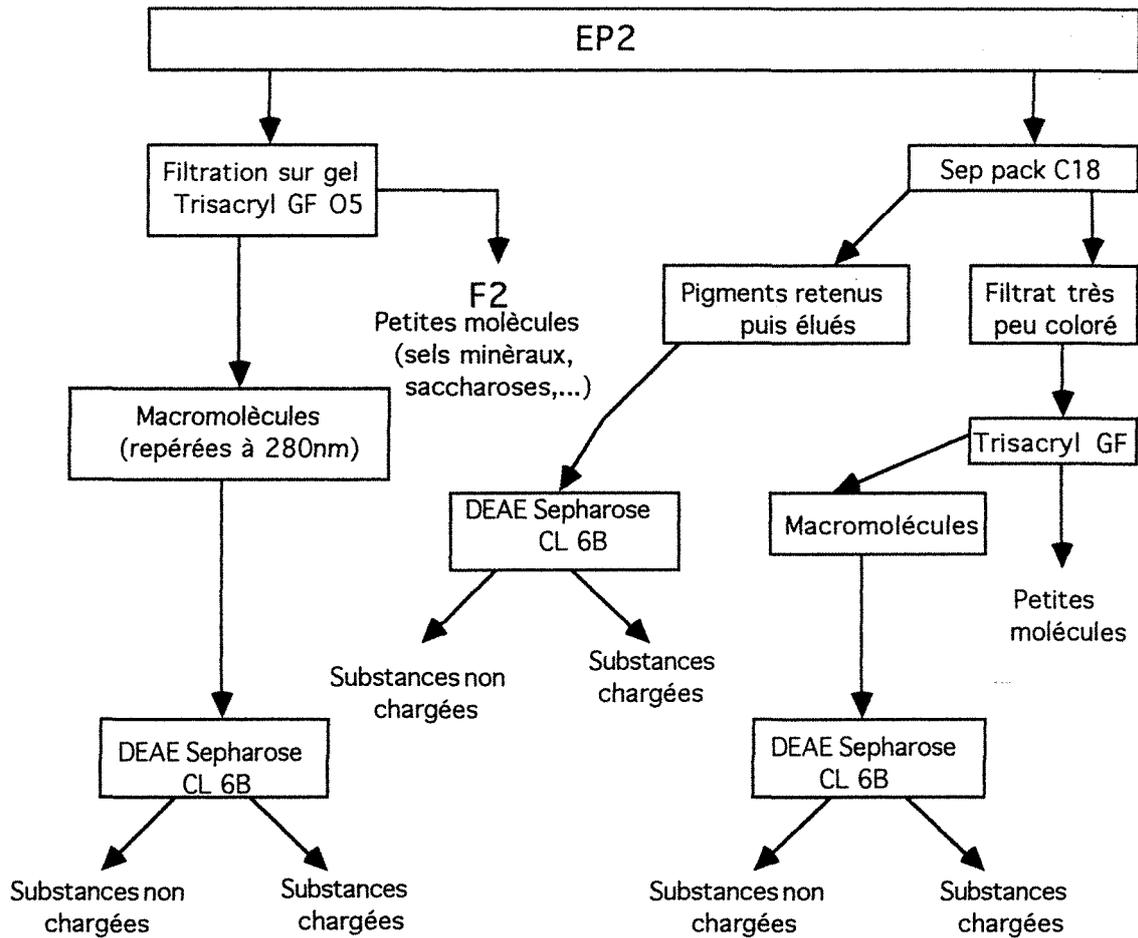


Figure 45: Schéma du protocole de l'évaluation des macromolécules chargées et non chargées

La partie polysaccharidique de ces macromolécules nécessite donc une étude plus poussée pour que l'on puisse déterminer leur origine (betteraves, différents produits de dégradations...)

CHAPITRE II

EVALUATION DES CONSTITUANTS
COLLOIDAUX ET MACROMOLECULAIRES
DANS LES JUS SUCRES.

Le saccharose dans une solution aqueuse échange un certain nombre d'interactions avec les molécules d'eau et les autres molécules de non-sucre (Hartel et coll.) (1991). Le saccharose peut prendre ainsi un ensemble de formes variées dans la solution, dépendant du type des non-sucre, des conditions de température et de concentration et de pH (Mathlouthi et col.) (1986), (McCain et col.) (1986). Il en résulte un équilibre qui sera modifié au moment de la cristallisation du saccharose. Inversement il est établi que la présence d'additifs tels que sirops de maïs, sucre inverti, gélatine, amidon etc... exercent un effet désastreux sur les conditions d'équilibre des molécules de saccharose en solution. Toutes ces substances tendent à abaisser la concentration de saturation du saccharose et limitent la vitesse de nucléation. La présence de ces substances a pour effet également de réduire la mobilité des molécules de saccharose et d'inactiver les centres de nucléation. En revanche certaines mélanoidines sont suspectées d'accroître la nucléation des cristaux de saccharose (Li Sui Fong et col.) (1982).

En général les constituants macromoléculaires tels que dextrines, pectines, dextranes, protéines ont pour effet aussi de réduire la vitesse de croissance des cristaux de saccharose, cet aspect a été particulièrement bien décrit par Smythe (1967). L'inhibition qui en résulte peut être le fait selon Hartel (1987)

- d'un accroissement de résistance au transfert de masse dans la solution ou à la surface du cristal.

- d'une incorporation sélective d'une partie des macromolécules dans le réseau cristallin ("tailor-made" impurities)

- du blocage des sites de croissance par adsorption des macromolécules à la surface du cristal.

Pour déterminer les constituants macromoléculaires dispersés dans les jus sucrés nous nous sommes inspirés des méthodes de relargage à l'alcool utilisées pour l'analyse des polysaccharides de canne (Nicol et col.)(1972) et des dextrans ainsi que pour la détermination du contenu en colloïdes totaux des jus de betterave, de Krylov et Khari (1971).

Cette méthode est fondée sur l'analyse néphélométrique des dispersions en milieu aqueux des précipités formés par addition d'alcool aux jus sucrés. Il nous a en effet semblé nécessaire de pouvoir apprécier l'état d'hydrophilie des constituants macromoléculaires des non-sucres en provoquant leur déstabilisation à l'aide d'un réactif connu pour son affinité à l'eau: l'alcool éthylique. L'éthanol va entrer en compétition avec les molécules les moins hydrophiles, ce qui aura pour effet d'entraîner leurs insolubilisation et leur précipitation.

I. Essais de relargages à l'alcool des EP2

Nous avons procédé au relargage des constituants macromoléculaires contenus dans deux EP2 (EPPEVILLE: EPP et ASSENS (Danemark): ASS). Le volume d'alcool rajouté à 100 g de chaque échantillon est de 400 ml.

Les essais ont été effectués de manière comparative à différents pH: 1,5 ; 4,5 ; 6,5 ; 9,0 par addition directe de H₃PO₄ 1N ; les poids des précipités recueillis

par centrifugation sont significativement plus élevés dans le cas de EPP par rapport à ASS.

La précipitation à pH 1,5 permet de recueillir la quasi totalité des substances relargables à l'alcool toutefois les poids des précipités recueillis sont trop élevés pour représenter uniquement les macromolécules relarguées. La présence d'une forte proportion de saccharose à côté des sels inorganiques, fausse la détermination.

Dans ce contexte, nous avons été amenés à rechercher l'existence d'associations entre saccharose et constituants polysaccharidiques par ultrafiltration, sur cônes AMICON de point de coupure 25.000 dal, de solutions concentrées de saccharose, enrichies en pectines hautement méthylées, dextrans de différents poids moléculaires et gomme arabique.

Rey et Labudza (1981) ont montré par ailleurs que les gommés ainsi que des sels, peuvent développer des interactions avec les sucres. Dans le cas des systèmes saccharose-amidon-eau ces interactions sont faibles et d'énergie inférieure à celle de la liaison hydrogène ce qui rejoint les observations de Janado et col. (1981) qui estiment que des interactions hydrophobes existent entre sucres et alcools.

Les résultats obtenus tendent à montrer que la quantité de saccharose retenu dépend de la concentration en polysaccharide rajouté à la solution. Les courbes de la figure 46 permettent de comparer les affinités relatives des polysaccharides tels que pectine, dextrans, gomme arabique.

On remarque que ce sont les dextrans qui semblent s'associer le moins et que les pectines hautement méthylées (plus de 65% de méthylation) qui retiennent le plus de saccharose.

Nous avons ensuite essayé de mettre au point une méthode de relargage par l'alcool des substances macromoléculaires dispersés dans les solutions sucrées . fondée sur la détermination du trouble résultant par néphélométrie.

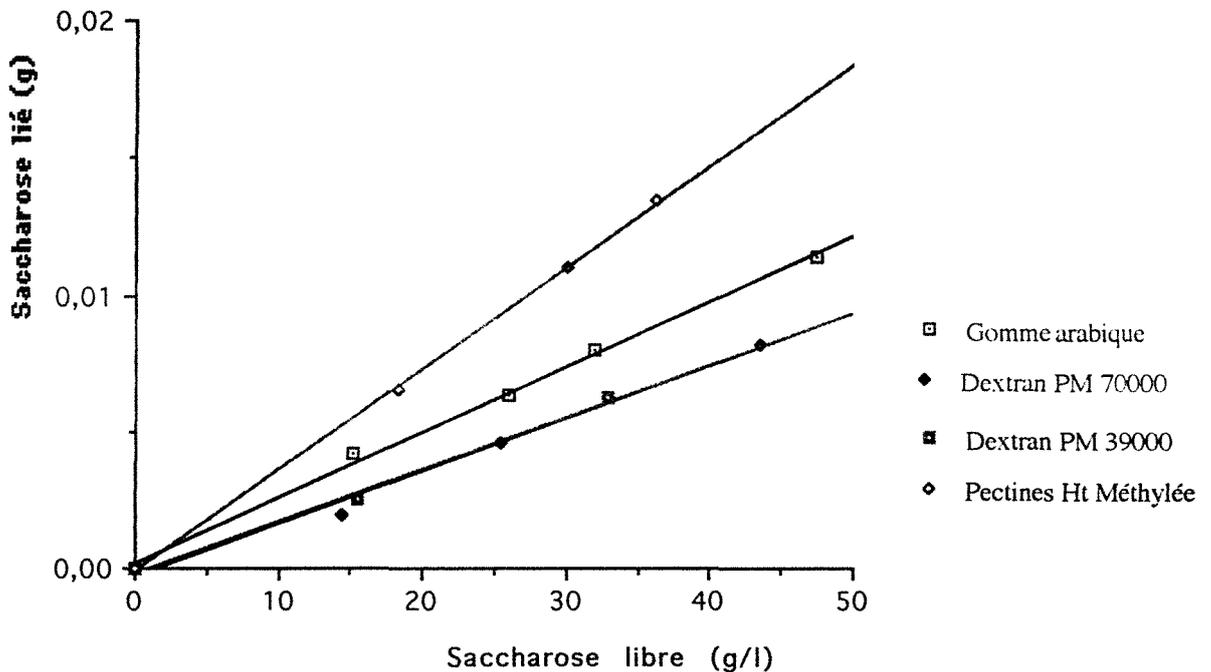


Figure 46: Etude de l'association du saccharose et de différents polymères d'origine végétale. Au départ les différentes solutions (7 ml) de saccharose de concentration variable contiennent toutes 0,035 g de polymère.

II. Essais néphélométriques

Au lieu d'ajouter à un milieu sucré donné une quantité déterminée d'alcool pour entraîner le relargage des macromolécules nous avons choisi de rajouter à un volume donné d'échantillon des quantités croissantes d'alcool éthylique pour suivre l'évolution de la turbidité résultante.

A l'aide d'un néphélémètre on suit l'évolution de l'intensité de la lumière diffusée suivant un angle de 90°. Afin de renforcer l'établissement des liaisons hydrogène avec les molécules d'alcool, la cuve (2 x 1 cm, 7ml) dans laquelle la titration est poursuivie est maintenue à 0°C à l'aide d'un bain de glace fondante.

L'intensité de la lumière diffusée est exprimée en unités arbitraires (100 unités formazine correspondent à la diffusion d'une suspension de référence formée de particules homogènes obtenues par réaction entre un volume d'une solution d'hexaméthylène tétramine à 10% (p/v) et un volume d'une solution de sulfate d'hydrazine à 1% puis dilution au 1/10).

A une solution sucrée ramenée à 20, 30 ou 40 Brix (voir Matériel et Méthodes) par dilution à l'aide de tampon phosphate de sodium (0,25 M), pH 4,8 on rajoute à 0°C des quantités croissantes d'alcool à 96 % (v/v).

Le mélange est maintenu sous agitation pendant 15 min à la température de la glace fondante avant transfert dans la cellule de mesure et détermination de l'intensité de la lumière diffusée.

Par la suite nous avons été amenés, afin de simplifier l'expérimentation, à fixer la concentration en extrait sec à 20 Brix cependant que le pH du milieu est abaissé à 6,5 par dilution à l'aide d'une solution de Na_2HPO_4 0,25 M afin d'atteindre une force ionique égale à 1,1 .

Dans ces conditions on minimise l'effet dû aux constituants inorganiques des jus sucrés en sachant par ailleurs que Na_2HPO_4 a pour effet de diminuer la vitesse de croissance des cristaux de saccharose (Rey et Labudza)(1981). Dans ces conditions de faibles quantités d'alcool de l'ordre de 0,5 à 3 ml par ml d'échantillon dilué suffisent pour entraîner un accroissement caractéristique et significatif de l'intensité de la lumière diffusée (DO).

La figure 47 montre complémentaiement que la plus grande sensibilité est atteinte pour une force ionique égale à 1,5 (concentration en Na_2HPO_4 de 0,25 mole/l).

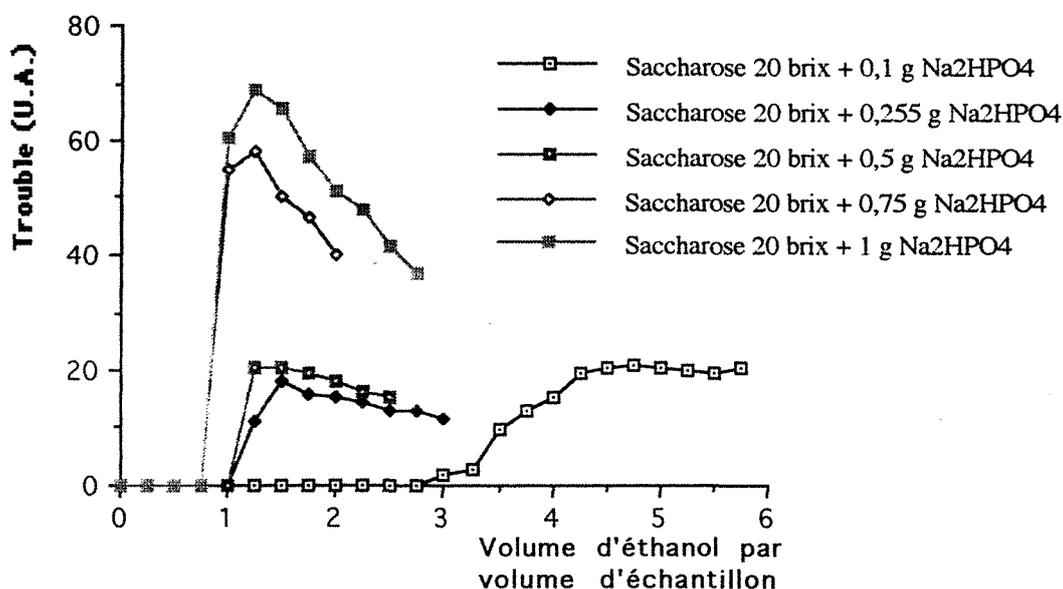


Figure 47: Etude du trouble à l'éthanol de solution de saccharose (20 brix) additionnées de différentes quantités de Na_2HPO_4 .

III. Comportement néphélométrique des sirops, sucres roux et égouts pauvres

L'étude du comportement néphélométrique de sirops, de sucres roux et d'égouts pauvres d'origines et de qualités différentes: EPP: Eppeville; NAK: Nakskov (Danemark) et SAS: Sasköpig (Danemark), a été conduite dans les conditions d'expérimentation définies précédemment, à pH 6,5, pour une teneur en matière sèche égale à 20 Brix.

III.1. Sirops

Les courbes d'évolution de la DO en fonction des volumes d'alcool rajoutés aux trois sirops EPP, NAK et SAS sont reportées figure 48. Une simple observation permet de voir qu'il est nécessaire de rajouter des volumes d'alcool plus élevés à NAK et SAS pour atteindre la turbidité maximale ce qui traduit un caractère hydrophile plus élevé que pour EPP.

On peut également observer que le coefficient de turbidité (C_a) que nous définissons par la quantité de trouble formé, exprimé en unités arbitraires, par volume d'alcool ajouté (à partir du moment où apparaît le trouble) passe par un maximum qui est différent d'un milieu sucré à un autre.

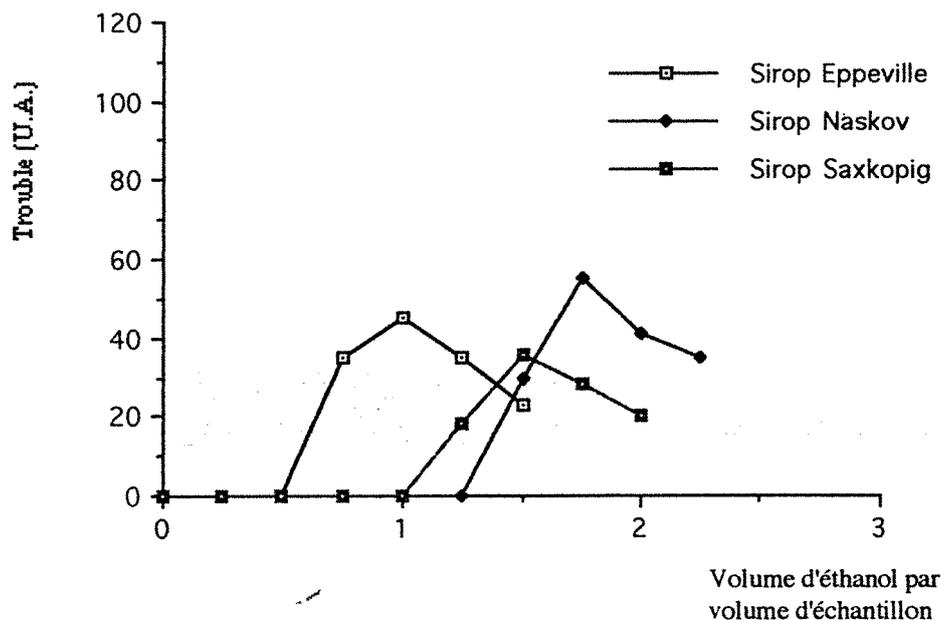


Figure 48: Etude du trouble à l'éthanol des sirops d'Eppeville (EPP), de Saxkopig (SAS) et de Naskov (NAK) (pH : 6,5 et 20 brix).

Dans le cas présent, les coefficients de turbidité $C_a = \frac{Tr (Do)}{D alc (ml)}$ de chaque sirop sont respectivement de 116, 86 et 69 pour NAK, EPP et SAS. Il y a lieu encore de remarquer que la forme des courbes de turbidité (DO = f (volume d'alcool rajouté) s'écarte d'autant plus de celle d'un sirop de sucre raffiné de même Brix (Figure 49), que la pureté est moins bonne. Ces différentes observations sont à corrélérer avec un état de pureté plus grand pour NAK, comparativement à EPP et à SAS.

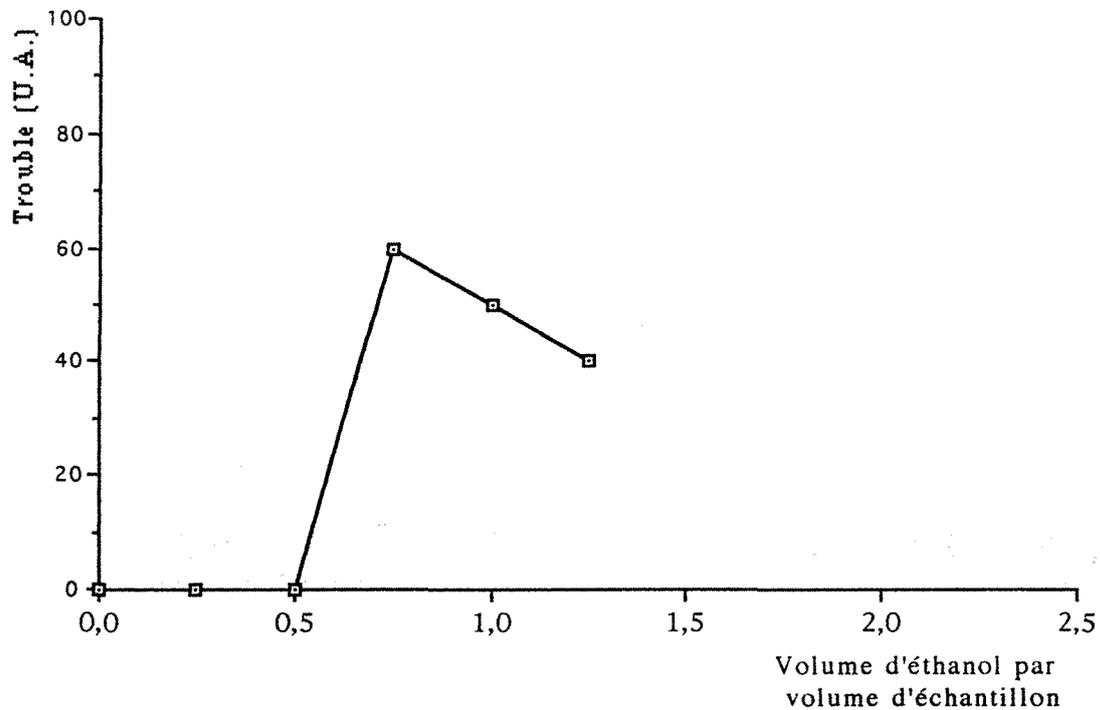


Figure 49: Etude du trouble à l'éthanol du sucre raffiné d'Eppeville

(pH : 6,5 et 20 brix).

III.2. Sucres roux

La comparaison de trois sucres roux correspondant aux sirops précédents EPP, NAK, SAS permet (figure 50) dans les mêmes conditions d'observation de voir que le caractère hydrophile du sucre roux EPP est amélioré par rapport au sirop, cependant que le coefficient de turbidité du sucre roux NAK est pratiquement très voisin de ceux des sirops (figure 48).

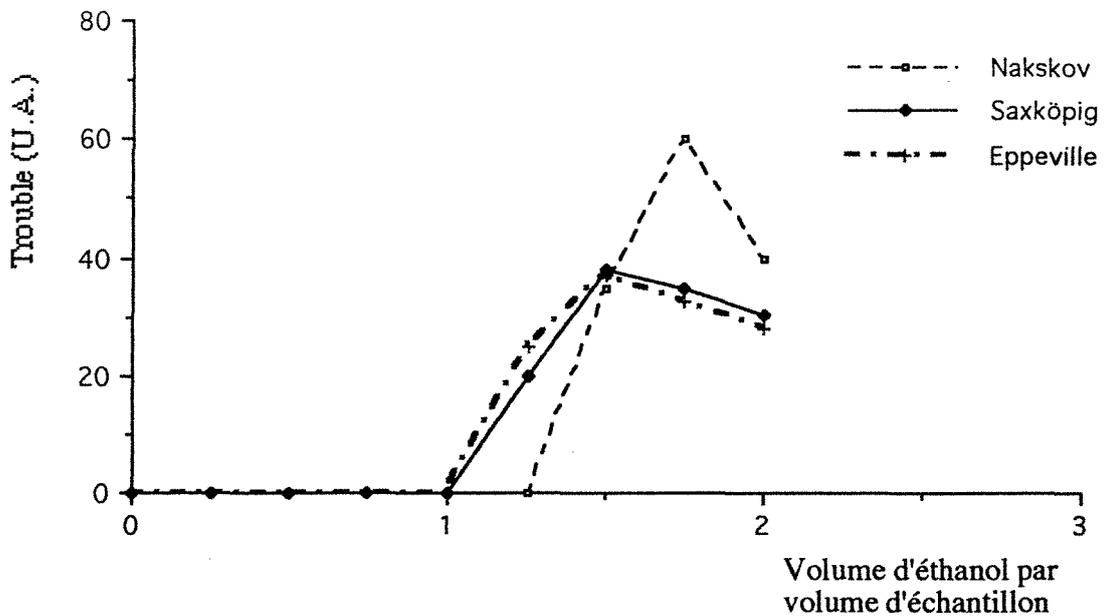


Figure 50: Etude du trouble à l'éthanol des sucres roux d'Eppeville (EPP), de Saxköpig (SAS) et de Nakskov (NAK) (pH : 6,5 et 20 brix).

Le coefficient de turbidité (C_a) d'EPP est de 67; il est le même que celui de SAS (68), toutefois la forme de la courbe de SAS est plus proche de celle du sucre raffiné pris pour référence, on peut donc en déduire par

simple corrélation un classement de qualité : NAK > SAS = EPP, conforme semble-t-il aux critères sucriers de pureté établis pour ces produits.

III.3. Egouts pauvres de 2ème jet (EP₂)

Les courbes d'évolution de la DO (figure 51) en fonction des volumes d'alcool rajoutés au système, les conditions d'observation étant les mêmes (20 Brix, pH : 6,5), permettent de mettre en évidence des différences notables de comportement entre les trois échantillons d'EP₂ (EPP), (NAK),(SAS).

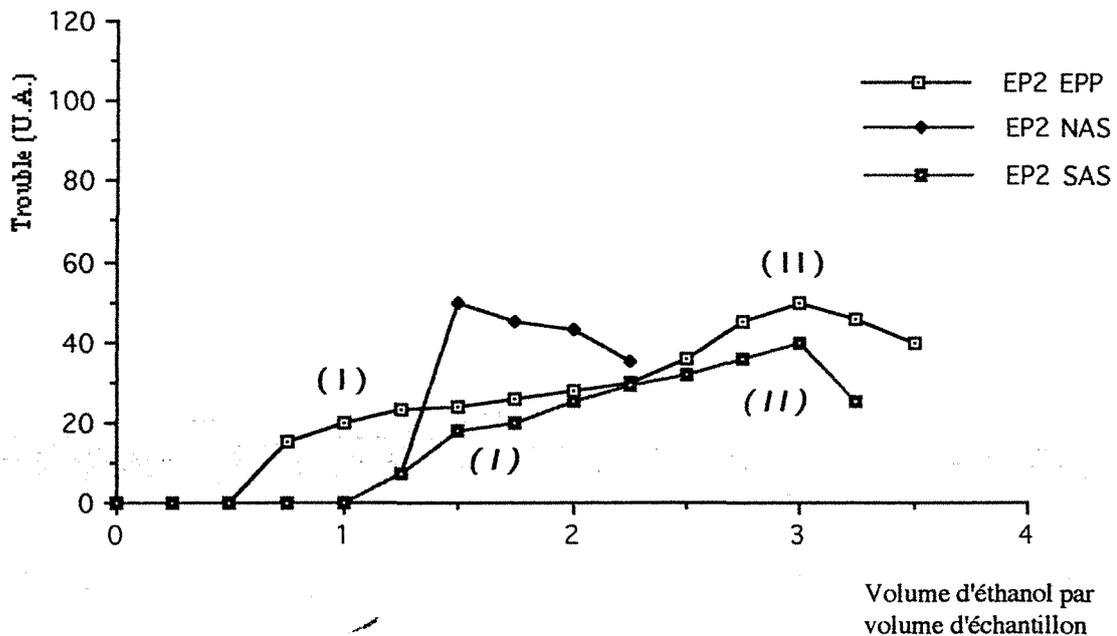


Figure 51: Etude du trouble à l'éthanol des EP₂ d'Eppeville (EPP), de Saxkopig (SAS) et de Nakskov (NAK) (pH : 6,5 et 20 brix).

Tandis que le seuil de turbidité (S) (défini par le volume minimal d'alcool pour lequel apparaît le trouble, en ml par ml d'échantillon) est de 0,5 pour EPP et de 1,0 pour NAK et SAS, le tracé des courbes de turbidité se distingue de celui des sirops et des sucres roux par la manifestation de deux maxima ainsi que par une extension des courbes qui se traduit par la mise en oeuvre de quantités d'alcool beaucoup plus grandes que pour les sirops et les sucres roux.

Tandis que pour NAK, le coefficient de turbidité est très voisin de celui des sirops et des sucres roux correspondants (100 au lieu de 118) (ce qui est en accord avec un produit de qualité) les courbes de turbidité d'EPP et de SAS se présentent de manière semblable.

Les coefficients de turbidité relatifs aux maxima I et II sont respectivement de 48 et 19 pour EPP et de 31 et 20 pour SAS, cependant que les volumes d'alcool nécessaires pour atteindre la turbidité maximale sont de 2,6 ml/ml d'échantillon pour EPP et de 2,0 ml/ml pour SAS (à partir des seuils de turbidité respectifs). D'autre part les rapports relatifs des volumes globaux d'alcool (R_a) nécessaires pour atteindre les turbidités maximales I et II dans le cas d'EPP et de SAS sont comme 3,4 et 2,0 ce qui signifie que le rapport substances hydrophiles sur substances plus hydrophobes est nettement plus grand pour EPP que pour SAS. Donc pour un volume global d'alcool pratiquement très voisin 3,1 ml pour EPP et 3,0 ml pour SAS, nécessaire pour obtenir la turbidité maximale (II) la distribution constituants très hydrophiles / constituants moins hydrophiles n'est pas la même dans les deux EP2. Lorsque ce rapport tend vers 1, on se rapproche des produits dont le comportement turbidimétrique est voisin de celui des sirops et des sucres roux.

Empiriquement on peut voir encore que les surfaces sous-tendues par les courbes de turbidité d'EPP et de SAS sont différentes, la surface la plus grande

étant imputable à EPP, ce qui signifie que pour une surface plus réduite (SAS) on a affaire à un produit de qualité meilleure.

III.4. Système triphasique

Pour compléter les résultats tirés de l'observation des courbes de turbidité précédentes nous avons étudié comparativement le comportement des trois fractions issues de la déstabilisation d'un EP2 d'EPP (40 Brix) (cf Fractionnement chromatographique-chapitre I): fraction liquide surnageante, fraction intermédiaire formée d'un magma mixte de cristaux de saccharose et de substances macromoléculaires (polysaccharides, protéines,...), fraction inférieure contenant essentiellement des cristaux de saccharose.

La courbe de turbidité imputable à la phase inférieure (figure 52) tend à confirmer un état de pureté élevée avec un coefficient de turbidité de 137 (un peu plus élevé que pour les sirops et sucres roux précédents dont la dilution est plus forte).

La phase intermédiaire marquée par la présence d'impureté est illustrée (figure 52) par une courbe de turbidité qui ressemble beaucoup aux courbes de turbidité des EP2. Toutefois, la manifestation d'un épaulement I et d'un maximum plus franc, II, avec des coefficients de turbidité élevés (140 et 90) tend à rapprocher ce produit d'un sucre roux plutôt que d'un EP2 dans la mesure où le rapport des volumes d'alcool globaux (R_a) correspondant aux turbidités maximales I et II se rapproche de 1 (il est de 1,3).

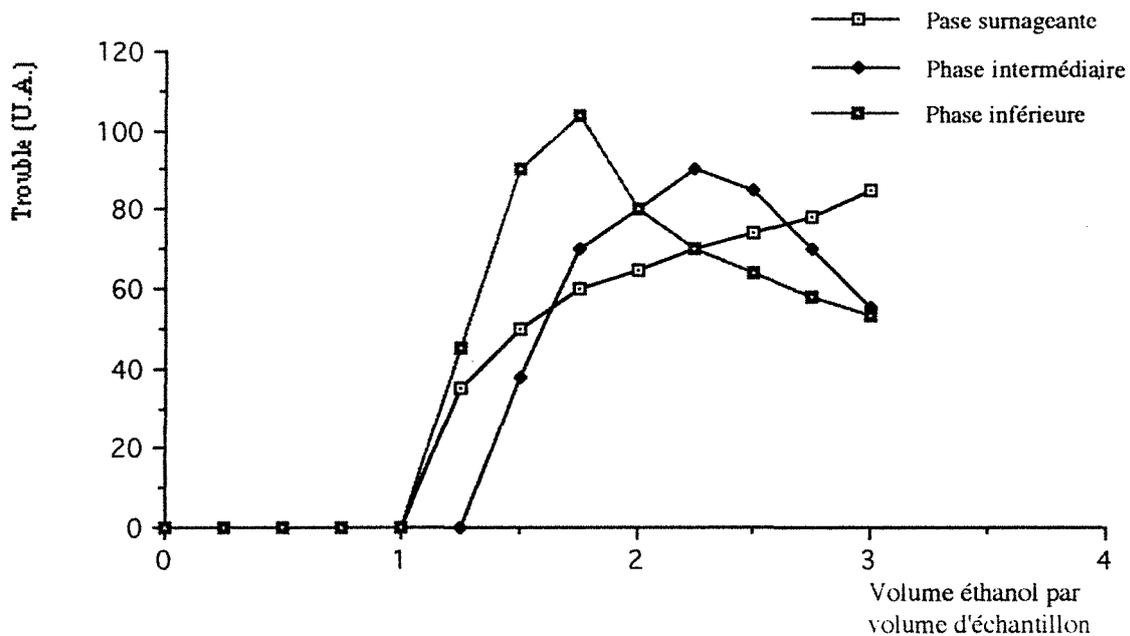


Figure 52: Etude du trouble à l'éthanol des trois phases d'un EP2 d'Eppeville

(pH : 6,5 et 40 brix).

La courbe représentative de la phase surnageante ressemble typiquement à celle d'un EP2 très impur avec un rapport $\frac{\text{Vol glob. II}}{\text{Vol glob. I}}$ de 4,2 ce qui traduit un enrichissement important en non-sucres.

IV. Effets du pH sur le comportement néphélométrique de deux EP2

Les conditions d'observation sont celles retenues précédemment pour les essais effectués sur les sirops, les sucres roux et les EP2 à savoir : 20 Brix , $\mu_i = 1,1$, $t = 0^\circ\text{C}$. Nous nous sommes fixés les pH de 6,5 et de 3,5 pour développer des essais comparatifs sur deux EP2 (EPP et ASS). Les pH de 6,5 et de 3,5 ont été choisis arbitrairement pour pouvoir modifier les conditions d'hydrophilie des constituants dissociables présents dans les deux EP2 en sachant néanmoins que pH : 3,5 est voisin de la zone de pI des EP2.

Les résultats sont illustrés par les figures 53 et 54.

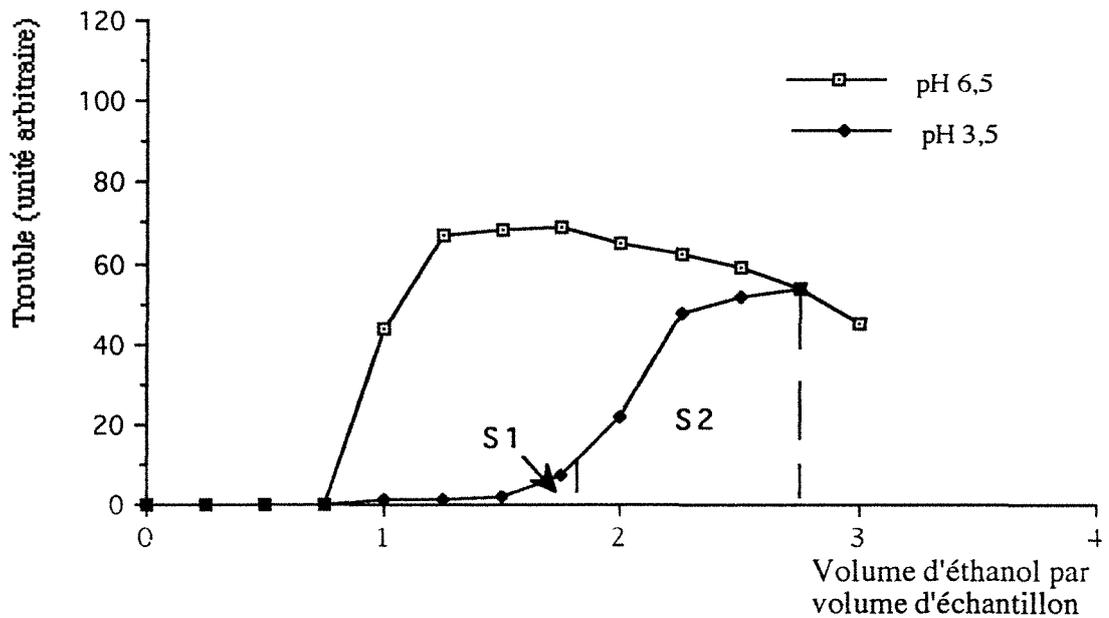


Figure 53: Test à l'éthanol de l'EP2 d'Eppeville (EPP) à deux pH différents-

Dilution : 20 brix

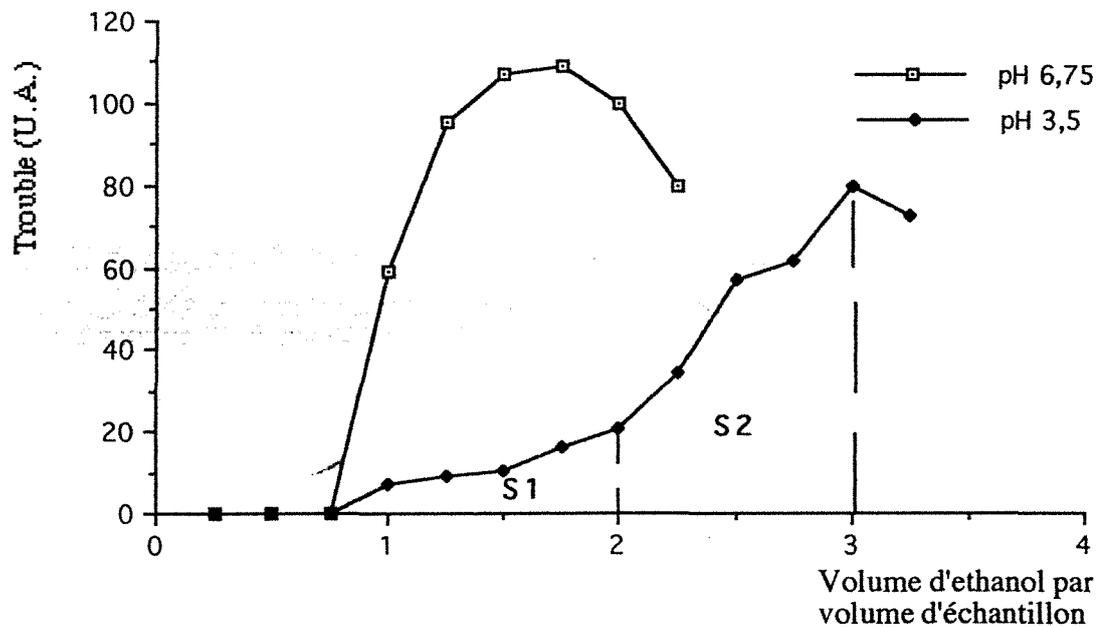


Figure 54: Test à l'éthanol de l'EP2 d'Assens (ASS) à deux pH différents.

Dilution 20 brix

Les coefficients de turbidité C_a respectifs sont à pH 6,5 de 68 UA/ml pour EPP et de 109 UA/ml pour ASS ce qui est en bon accord avec la pureté plus élevée de l'EP2 ASS, comparativement à celle de l'EP2 EPP.

Si l'on pousse la comparaison plus loin, on constate que le rapport des surfaces sous-tendues par les courbes de turbidité d'un même EP2 limitées au maximum de turbidité, sont les mêmes pour ASS et pour EPP:

EP2	Rapport = $\frac{\text{Surf pH 6,5}}{\text{Surf.pH 3,5}}$
EPP	1,20
ASS	1,18

ce qui signifie que l'influence du pH sur la turbidité du milieu s'exerce de la même manière sur les deux EP2. En revanche, le rapport volume d'alcool nécessaire pour atteindre le maximum de turbidité à pH 6,5 sur le volume d'alcool nécessaire pour atteindre le maximum de turbidité est un peu plus élevé pour ASS (1,8) que pour EPP (1,6).

La comparaison visuelle des courbes de turbidité à pH 3,5 des deux EP2 permet encore de voir que les maxima de turbidité sont atteints pour des volumes d'alcool très voisins soit 3 ml pour ASS et 2,8 ml pour EPP. par contre le rapport de ces surfaces S_2/S_1 sous-tendues par une même courbe de turbidité fait apparaître l'existence d'un équilibre au sein d'un même EP2 entre substances les plus hydrophiles et constituants plus hydrophobes. Cela se traduit pour EPP et ASS par des proportions différentes: $\frac{S_2}{S_1}$ (EPP) = 5,0 et $\frac{S_2}{S_1}$ (ASS) = 3,0 ce qui signifie qu'à un pH voisin du pI la proportion de

constituants plus facilement déshydratables par l'alcool est plus grande pour ASS que pour EPP.

Dans le cas d'EPP la résistance à la déshydratation des non-sucres est à la fois illustrée par un coefficient de turbidité faible (68) et un rapport $\frac{S_2}{S_1}$ de 5,0 tandis que pour ASS, plus apte à la déshydratation, ces mêmes valeurs sont respectivement de 109 et de 3,0. La pureté d'ASS étant meilleure que celle d'EPP nous sommes tentés de considérer que l'aptitude à la déshydratation des non-sucres constitue un critère de pureté à prendre en compte.

V. Effets sur la turbidité de différentes fractions isolées de non sucres d'EP2

V.1. Fraction C18 colorée rassemblant les pigments isolés sur cartouche Sep pak

La fraction colorée a été isolée par fractionnement chromatographique d'un EP2 d'Eppeville sur cartouche Sep Pak C18 selon la méthode décrite dans Matériel et Méthodes.

L'addition de quantités croissantes de cette fraction à un milieu reconstitué à partir de sucre raffiné dans les conditions habituelles des essais néphélométriques (20 brix, pH = 6,5) permet d'apprécier l'influence de ces constituants par rapport au comportement du sucre raffiné pris pour référence.

L'examen des courbes de turbidité (figure 55) permet de montrer que le coefficient de turbidité (C_a) est pratiquement le même pour des

teneurs respectives de 5 et 15 mg de pigments. Sa valeur est respectivement de 150 UA/ml pour 15 mg et de 140 UA/ml pour 5 mg ce qui montre bien que ces essais ne revêtent pas un caractère quantitatif. En revanche le rapport des volumes d'alcool nécessaires pour atteindre le maximum de turbidité rapporté à celui qui caractérise le sucre raffiné $\frac{\text{Vol max}}{\text{Vol max ref}}$ est égal dans les deux cas à 1,3 ce qui traduit le caractère hydrophile de ces substances et leur résistance à la déshydratation en remarquant toutefois que leur présence dans le milieu reconstitué n'entraîne pas de modification caractéristique de la courbe de turbidité. Le comportement d'un tel système est à rapprocher de celui d'un sucre roux.

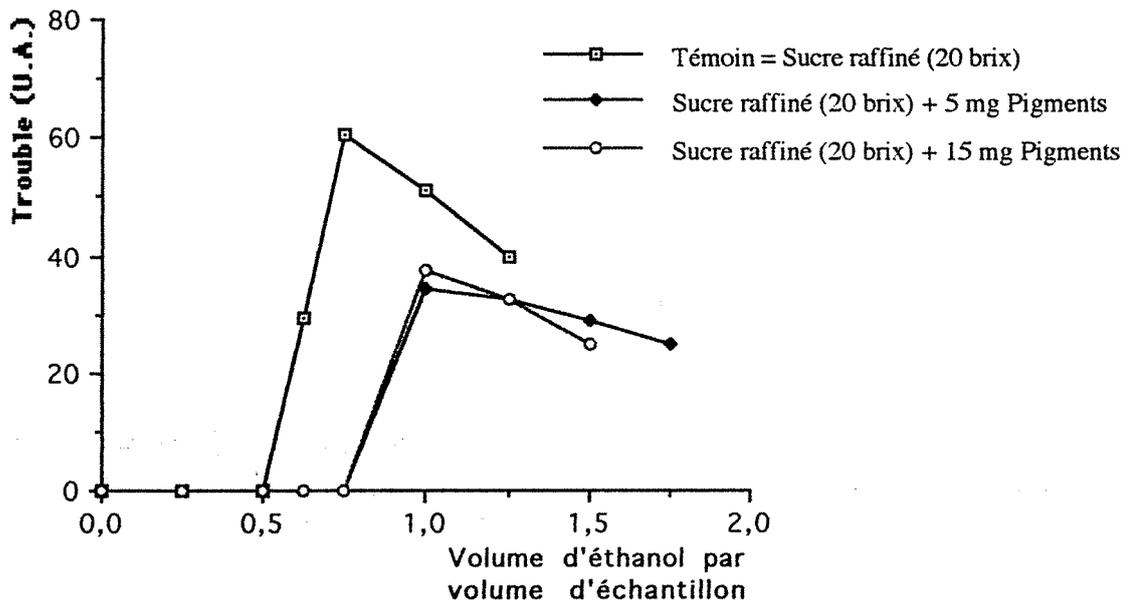


Figure 55: Etude du trouble à l'éthanol du Sucre raffiné additionné des pigments d' EP2 d'Eppeville obtenus par passage sur Sep Pak C18 et comparaison avec du sucre raffiné (pH : 6,5 et 20 brix).

V.2. Fraction d'EP₂ dépourvue de pigments

La fraction décolorée recueillie par passage de l'EP₂ sur Sep Pak C₁₈ a été testée directement après reconstitution d'une solution à 20 brix et pH = 6,5 pour apprécier comparativement son influence sur la turbidité. La figure 56 illustre ce comportement comparativement à celui du sucre raffiné pris pour référence.

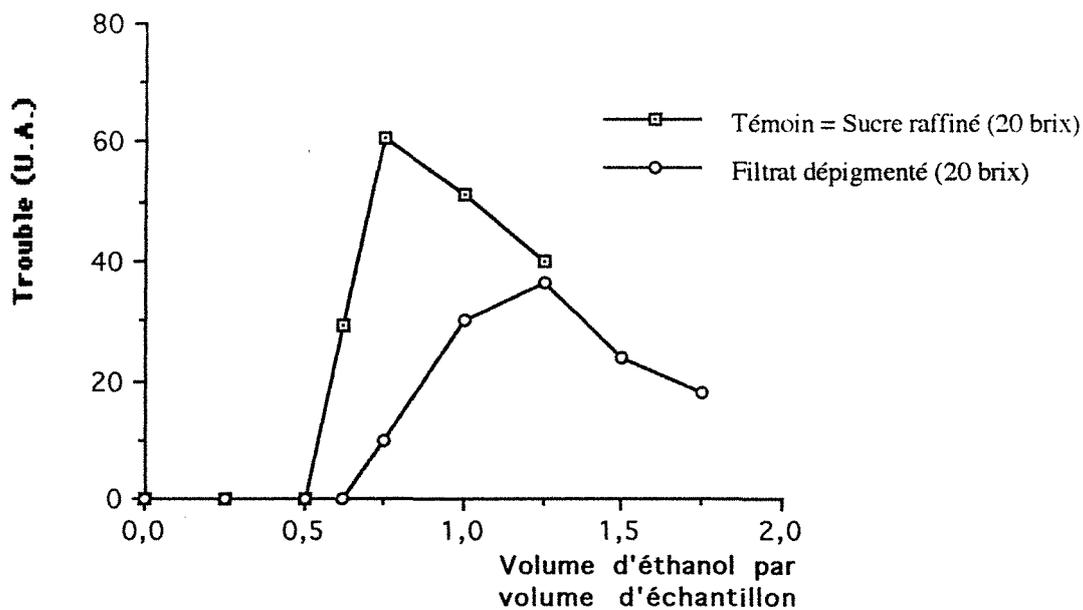


Figure 56: Etude du trouble à l'éthanol d'un EP₂ d'Eppeville dépigmenté par passage sur Sep Pak C₁₈ et comparaison avec du sucre raffiné

(pH : 6,5 et 20 brix).

Le coefficient de turbidité est de 48 UA/ml cependant que le rapport $\frac{\text{Vol max}}{\text{Vol max ref}}$ est de 2,0 ce qui traduit comparativement aux pigments un effet beaucoup plus marqué de ces substances. Elle manifestent

typiquement une résistance à la déshydratation et le profil de la courbe de turbidité est proche de celui d'un EP₂.

Ces observations permettent donc de penser que l'incidence des pigments sur la cristallisation du saccharose est moins déterminante que celle des autres non-sucres.

VI. Incidence des fractions moléculaires et macromoléculaires d'un EP₂ sur la turbidité

VI.1. Comparaison des fractions macromoléculaires F₁ de deux EP₂.

Le fractionnement de deux EP₂ EPP et NAK sur Trisacryl GF05 conduit (voir : Fractionnement) à deux fractions F₁ de PM >3 000 et F₂ de PM <3000. L'addition de quantité croissante de F₁ à un milieu reconstitué formé de sucre raffiné dans les mêmes conditions que pour les essais avec la fraction colorée et la fraction non retenue sur Sep Pak a conduit aux résultats illustrés par les courbes de turbidité des figures 57 et 58

Dans le cas de EPP (figure 57) des quantités croissantes de F₁ entraînent une diminution du coefficient de turbidité C_a cependant que le rapport $\frac{\text{Vol max}}{\text{Vol max ref}}$ s'accroît et passe de 1,4 pour 0,08 g de F₁ à 2,3 pour 0,27 g. Ces substances tendent à conférer un caractère plus hydrophile au milieu sucré cependant que la déformation des courbes de turbidité permet de les assimiler à celles des EP₂.

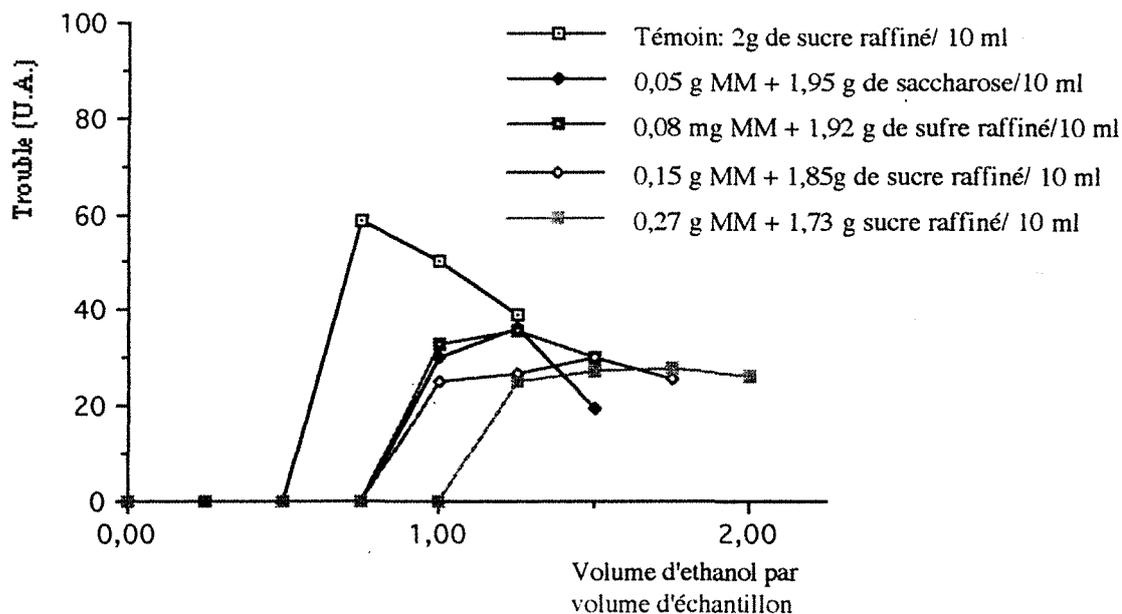


Figure 57 : Incidence des macromolécules (F1) de l'EP2 d'Eppeville sur le test à l'éthanol

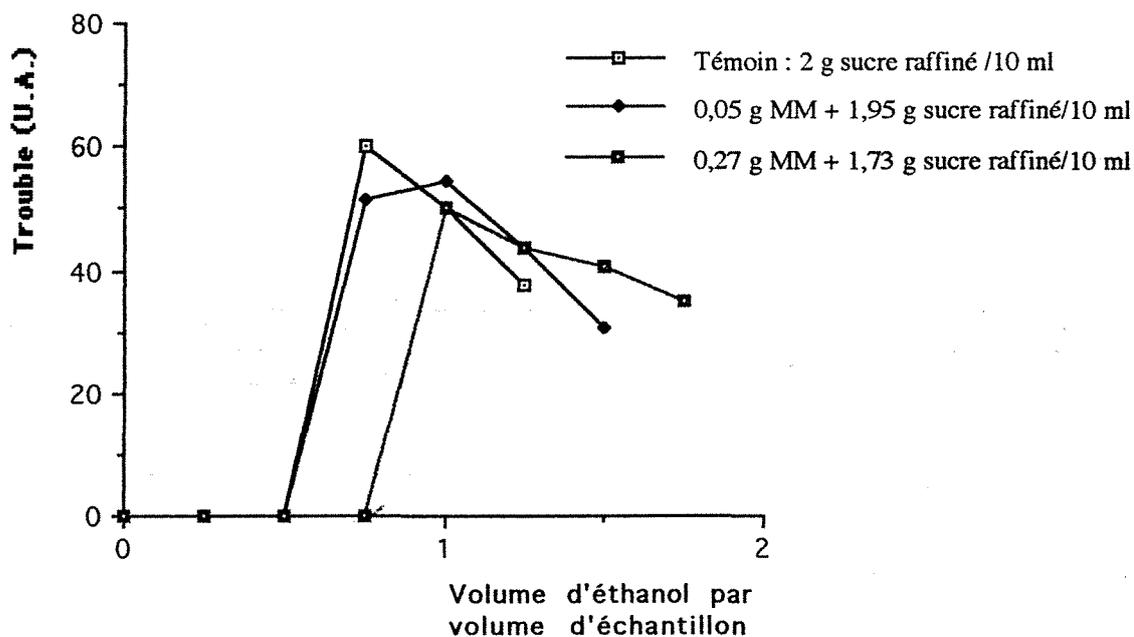


Figure 58: Incidence des macromolécules (F1) de l'EP2 Nakskov (NAK) sur le test à l'éthanol

Dans le cas des constituants macromoléculaires F₁ issus du fractionnement de l'EP₂ NAK sur Trisacryl (Fig. 58), on est amené à constater une plus faible diminution du coefficient de turbidité, comparativement à EPP en même temps que du rapport $\frac{\text{Vol max}}{\text{Vol max ref}}$ qui passe de 1,0 pour 0,05 g de F₁ à 1,35 pour 0,27 g.

La simple comparaison des courbes de turbidité des deux échantillons EPP et NAK permet de dire que les constituants F₁ de NAK de caractère moins hydrophile que ceux d'EPP affectent en même temps beaucoup moins la cristallisation du milieu sucré. Néanmoins, comme pour les autres fractions de non-sucres déjà étudiées, il n'a pas été possible avec nos conditions expérimentales, de mettre en évidence une relation quantitative entre l'expression des différents rapports (coefficient de turbidité C_a, $\frac{\text{Vol max}}{\text{Vol max ref}}$) et les concentrations en non-sucres.

VI.2. Comparaison des fractions moléculaires F₂ de deux EP₂

La comparaison a porté sur les fractions F₂ de PM <3 000 issues du passage successif des EP₂ EPP et NAK sur colonne de Sep Pak C₁₈ et de Trisacryl afin d'éliminer l'incidence de la fraction colorée.

Les résultats sont illustrés par les courbes de turbidité des figures 59 et 60

Le coefficient de turbidité plus faible de F₂ d'EPP associé à un rapport $\frac{\text{Vol max}}{\text{Vol max ref}}$ un peu plus élevé (1,5 au lieu de 1,3) comparativement à NAK, confère à ses substances un caractère un peu plus déstabilisant.

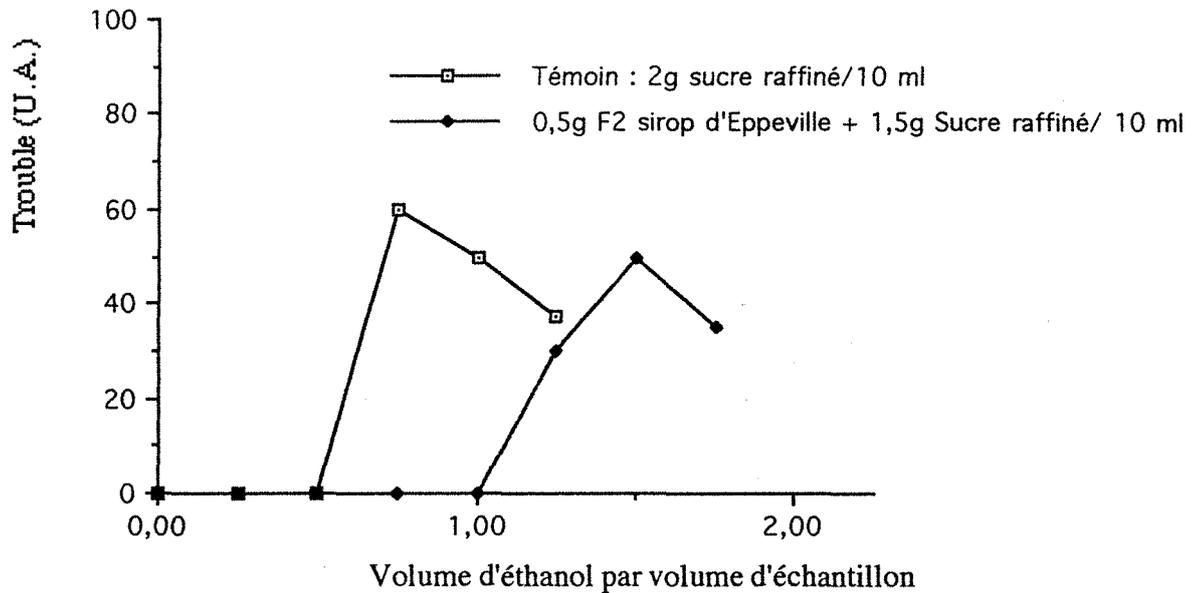


Figure 59: Test à l'éthanol sur les fractions F2 issues du sirop d'Eppeville (EPP).

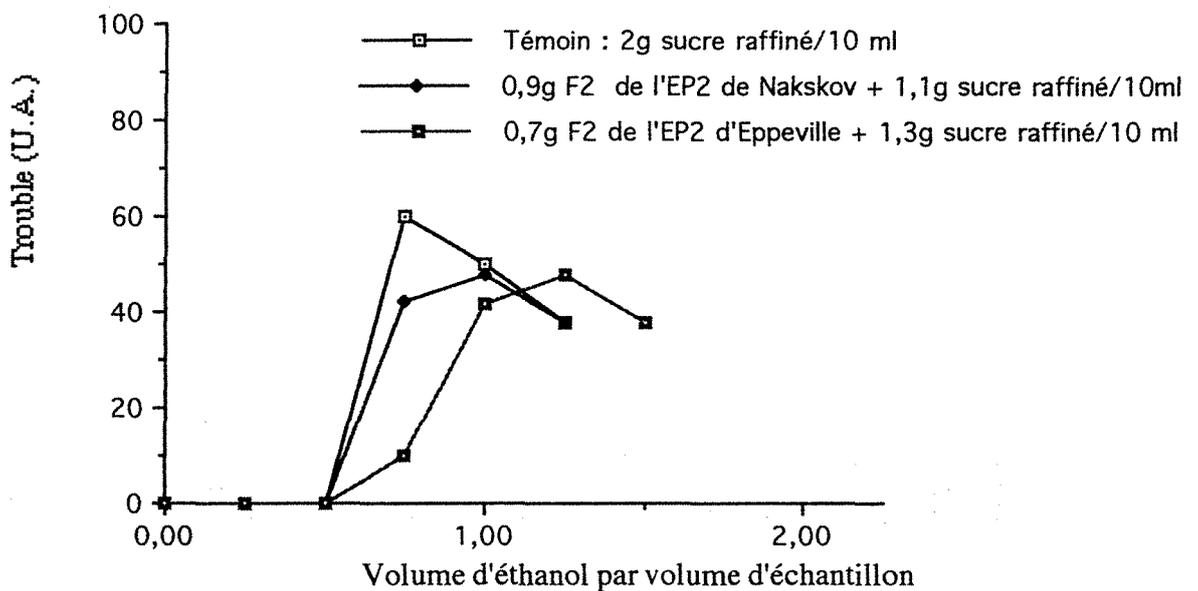


Figure 60: Test à l'éthanol réalisé sur un mélange des fractions F2 issues des EP2 d'Eppeville (EPP) et de Nakskov (NAK) (après passage sur colonne de Trisacryl GF 05) et de sucre raffiné .

VII. Incidence des polysaccharides de sirops de canne à sucre sur la turbidité

Enfin pour clore cette étude nous avons étudié l'influence de macromolécules isolées par dialyse d'un sirop de canne à sucre. Les essais sont poursuivis dans les mêmes conditions que les essais précédents après addition des différents non-sucre à une solution aqueuse de sucre raffiné amenée à 20 Brix et à pH 6,5. Les résultats illustrés par les courbes de la figure 60 font ressortir d'une manière nette un effet déstabilisant de ces substances comparativement plus marqué que celui de la fraction F₁ d'EPP.

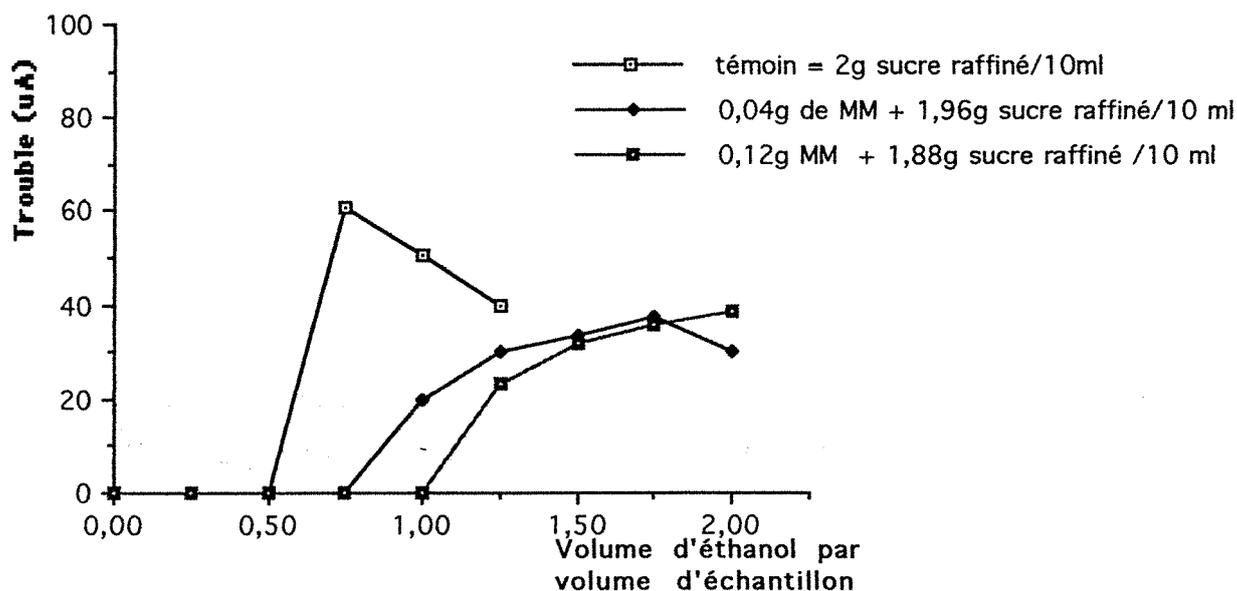


Figure 61: Test à l'éthanol réalisé sur un mélange de macromolécules issues de sirop de sucre de canne après dialyse et de sucre raffiné .

La forme des courbes de turbidité est comparable à celle des EP₂ ce qui confirme bien la participation active des polysaccharides au processus de déstabilisation du milieu sucré par l'intermédiaire de l'alcool.

VIII. Conclusion

La compétition des différents constituants hydrophyles (saccharose- substances polyosidiques) pour l'eau à été étudiée par déplacement de l'équilibre "naturel" par addition d'alcool au milieu en vue de provoquer une floculation fractionnée que l'on peut suivre par néphélométrie.

Ainsi nous avons noté d'une part l'influence de la concentration en matière sèches sur la déstabilisation de la solution par l'addition d'éthanol et d'autre part que la diminution du pH influence l'apparition du trouble plus nettement à 20 Brix qu'à 40 Brix.

L'étude du test à l'alcool montre cependant peu de différences entre les sirops étudiés, avec toutefois, dans le cas du sirop d'Eppeville une précipitation qui semble moins franche que dans les autres cas et la révélation de produits plus hydrophobes.

En revanche, l'étude des EP₂ a montré une grande différence entre les différents échantillons étudiés. L'EP₂ Nakskov précipite relativement facilement suivi par l'EP₂ d'Appeldorn. Ceci nous semble être en gage de cristallisation plus facile. En ce qui concerne l'EP₂ Saksxopig il présente un trouble difficile à provoquer puisqu'il faut près du double d'éthanol pour atteindre le maximum. L'EP₂ d'Eppeville vient à la fin, il présente une difficulté qui est encore accusée.

CHAPITRE III

LES PULPES DE BETTERAVE :
INCIDENCE DE LA DEGRADATION
ALCALINE

et

VALORISATION

I. Introduction

Les pulpes de betteraves sont constituées de 70% de polyosides avec essentiellement de la cellulose, des pectines et hémicelluloses. Ces constituants plus la lignine peuvent être regroupés sous le terme "fibres alimentaires". C'est un terme général qui sert à désigner polyosides et lignine, qui ne sont pas digérés par les enzymes du tractus digestif humain. (Trowell 1974) (Trowell 1976) (Asp 1987) (Cummings 1981). On les trouve principalement au niveau de la paroi cellulaire des végétaux. Les fibres alimentaires ont un rôle de "lest" du bol alimentaire et semble-t-il de prévention dans certaines maladies métaboliques et digestives (Burkitt et col.1974) (Kelsay, 1978)

Le son est considéré actuellement comme la source la plus importante de fibres dans l'industrie alimentaire (Zabik et col.1977). Or, la teneur en fibres de la betterave est nettement plus élevée que celle du son, et pourrait présenter par conséquent un intérêt économique important.

Le problème qui nous a été posé concerne plus particulièrement des fibres contenues dans les pulpes, à l'issue de l'extraction du saccharose.

Nous verrons successivement:

- les fibres dont l'intérêt est surtout diététique
- les pectines pour leur propriétés gélifiantes
- les polyosides en général en tant que générateurs potentiels de sucres solubles.

I.1. Les fibres

La modification chimique ou physique des fibres de betterave a fait l'objet de certains travaux dans le but de comparer leurs propriétés physico-chimiques (Michel et col. 1988) (Rouau et col.1987) (Bertin et col.1988)

I.1.1. Extraction à l'oxalate

Des extractions séquentielles, utilisant l'oxalate, l'acide chlorhydrique à chaud et la soude à froid, sont couramment utilisées pour extraire les pectines (Rombouts, et col.1986). La composition chimique et la structure des fibres obtenues sont très modifiées par les procédés d'extraction:

- extraction à l'oxalate: les différences de composition et de propriétés physico-chimiques sont faibles.

- extraction acide et alcaline: les fibres résiduelles sont riches en protéines, en lignine, en hémicelluloses, en cellulose et en acide galacturonique non méthylé.

La capacité d'échange des cations augmente considérablement, car le contenu en groupements méthylesters est très diminué. Cette propriété est liée au contenu en acide galacturonique non méthylé, car ce sont les seuls groupements ioniques des fibres.

La capacité de rétention d'eau est très élevée pour les fibres et surtout pour les fibres qui incorporent le minimum de matériel amorphe. Cette propriété dépend de la dissociation des groupements carboxyliques, mais également de la force ionique du milieu. Les fibres, sous forme salifiée, manifestent une capacité de rétention de l'eau élevée en raison d'un accroissement des forces de répulsion de nature ionique.

I.1.2. Traitement des pulpes à l'éthanol

Ce traitement consiste à laver et broyer les pulpes dans l'éthanol à 96%. (Michel, col. 1988) ont étudié les variations de la composition chimique et des propriétés physico-chimiques, en fonction de la taille des particules. Les différentes fractions obtenues, ont une composition chimique quasi-identique à celle de la pulpe d'origine.

La similitude entre les capacités d'échange d'ions de la pulpe d'origine et des fibres obtenues s'explique par leurs compositions chimiques voisines. Les pulpes et les fibres se comportent comme des échangeurs d'ions monofonctionnels faibles.

La capacité de rétention d'eau est importante à la fois pour les pulpes et les fibres. Cette propriété n'est pas influencée par la taille des particules, ni par le pH. Ces critères physiques sont la résultante d'un équilibre qui s'établit entre les polysides chargés à caractère hydrophile et les constituants hydrophobes.

I.2. Les pectines ou substances pectiques

I.2.1. Structure des pectines

Les pectines représentent l'une des principales composantes de la paroi pectocellulosique des végétaux. Les pulpes de betteraves sont très riches en pectines, avec 20% du poids sec en acide galacturonique (McCready .1966)

La chaîne principale des pectines est formée de résidus d'acide galacturonique (Whistler, col.1953), liés en $\alpha(1\rightarrow4)$. Cette chaîne est également appelée acide pectique. La chaîne est interrompue par des résidus de L(-) Rhamnose, sous forme pyranosique, liés en $(1\rightarrow4)$ ou $(2\rightarrow1)$ aux résidus d'acide galacturonique. Ces résidus représentent 80% de la composition totale des pectines de betterave (Mc Cready et col.1960). Les fonctions carboxyliques des résidus galacturoniques peuvent être estérifiées par le méthanol et les fonctions alcools secondaires par l'acide acétique.

D'autre part, des groupements esters féruloyles sont liés aux chaînes latérales des sucres neutres. Ces groupements phénoliques peuvent jouer un rôle important dans les propriétés gélifiantes des pectines (Rombouts et col.1986) (Rombouts et Thibault. 1986).

Les pectines possèdent des propriétés physico-chimiques très intéressantes pour l'industrie alimentaire (viscosité, gélification) qui justifient leur qualité d'hydrocolloïdes.

I.2.2. Dégradation des pectines

Les études des pectines ont porté sur les pectines purifiées (Guillon, Thibault. 1987) et sur les fractions de pectines (Rombouts et Thibault. 1986) (Guillon et Thibault 1986) obtenues par la méthode d'extraction de Rombouts, et Thibault. (1986)

La dégradation des pectines peut être poursuivie par voie enzymatique ou chimique (Van et col.1987). Il existe deux grands types de réactions :

- désestérification: il y a libération de méthanol et d'acide polygalacturonique ou acide pectique. Ce dernier peut réagir avec certains ions métalliques pour former des précipités

- dépolymérisation: elle est le résultat de l'hydrolyse des liaisons $\alpha(1\rightarrow 4)$ de la chaîne principale ou du processus de β élimination.

a. dégradation chimique

Le facteur température est très important. La saponification à froid permet d'éliminer les groupements méthylesters et acétylesters.

La β élimination est de nature chimique; elle se produit en milieu alcalin a chaud et entraîne l'hydrolyse principalement des résidus acides galacturoniques au voisinage des résidus rhamnose. La déméthylation a pour effet d'inhiber la réaction de β élimination : il existe ainsi une relation étroite entre le degré de méthylation et la limite de dégradation.

b. dégradation enzymatique

Chaque réaction d'hydrolyse est spécifique et dépend de la structure des substrats sur lesquels elle s'exerce. Ainsi on trouve les enzymes pectolytiques "saponifiantes" qui hydrolysent les liaisons esters méthyliques; l'enzyme la plus utilisée est la pectine méthyl estérase. Les enzymes pectolytiques dépolymérisantes sont diversifiées et dépendent du substrat, du mode d'action et de la réaction mise en jeu. L'endopectine lyase est une enzyme qui agit, par β élimination et au hasard, sur les résidus méthylgalactosyluroniques. Le degré de méthylation doit être élevé (Rombouts, Thibault. 1986). En revanche l'endopectate lyase agit par β élimination, au hasard sur des acides pectiques faiblement méthylés. Les groupements acétyles peuvent bloquer la réaction. L'endopolygalacturonase hydrolyse les liaisons α (1--->4) de l'acide pectique déméthylé ou faiblement méthylé; le pourcentage d'hydrolyse dépend encore du degré de méthylation, d'où l'intérêt de déméthylé la molécule (Guillon et Thibault. 1987). Cette enzyme contribue à diminuer la teneur en acide galacturonique et à augmenter les teneurs en sucres neutres et en acide férulique des produits d'hydrolyse. L'arabanase et la galactanase hydrolysent respectivement les résidus arabinosyles et galactosyles

Il apparaît intéressant d'associer ces différentes enzymes afin d'obtenir des fragments pectiques de différentes compositions et de différentes structures. On obtiendra ainsi des fragments riches, soit en acide galacturonique déméthylé, soit en oses neutres. etc...

La comparaison des propriétés physico-chimiques des différents types de fragments obtenus est très importante (Guillon et Thibault. 1987). ces propriétés trouvent des applications industrielles pour l'élaboration de divers produits alimentaires (agents stabilisants dans les boissons, agents absorbant d'eau...).

I.3. Les polyosides de la betterave

Dans la littérature on trouve plusieurs études qui portent sur la transformation enzymatique des polyosides de la betterave, en sucres solubles (Sidi ali et col.1984) (Schaffeld et Illianes. 1987) (Moloney et col.1984) (Beldman et col.1984). Ce matériel peut être hydrolysé aussi par voie chimique.

I.3.1. Hydrolyse chimique

L'hydrolyse acide donne lieu à une forte production de glucose et de sucres solubles; le temps de la réaction est relativement court. Cependant, cette réaction à l'inconvénient de conduire en même temps à la formation de substances indésirables (phénols si la fibre en contient et

furfurals par déshydratation des sucres en milieu acide) (Knappert et col.1980)

I.3.2. Hydrolyse enzymatique.

L'hydrolyse enzymatique de pulpes a souvent été privilégiée car elle apparaît comme une méthode douce et spécifique. Pour les pulpes de betterave, elle présente deux intérêts:

- la rupture de la paroi cellulaire entraînant la solubilisation des polysaccharides de la paroi végétale et la libération du saccharose résiduel que l'on hydrolyse en glucose et fructose. (Sreenath et col.1987).

- la production de sucres fermentescibles à partir de polyosides totaux (cette opération est le plus souvent appelée saccharification). Les sucres solubles ainsi obtenus peuvent servir de substrat de croissance à de nombreux micro-organismes.

Les principales enzymes utilisées sont: cellulases, endoglucanases, exoglucanases, glucosidases, carboxyméthylcellulases, pectine lyases, polygalacturonidases et en fin pectinesterases (Moloney et col.1984), (Sidi Ali et col.1984) (Schaffeld et Illianes. 1987) ,(Beldman et col.1984).

En raison de la complexité des structures des polyosides de la betterave plusieurs de ces enzymes sont toujours nécessaires pour provoquer leur hydrolyse.

I.3.3. Influence des prétraitements sur le rendement de l'hydrolyse

Les rendements de l'hydrolyse enzymatique sont très souvent faibles; il est donc intéressant de réaliser des prétraitements chimiques ou enzymatiques, afin de simplifier les structures naturelles complexes.

a. prétraitements chimiques

Le traitement à l'acide peracétique accroît l'hydrolyse des hemicelluloses et des pectines. L'hydrolyse acide douce permet la libération des hemicelluloses sans altération profonde de la cellulose. La température est un facteur important car elle intervient dans la solubilisation des protéines, des pectines etc...(Schaffed et Illians. 1987).

b. prétraitements physiques

Il s'agit essentiellement de broyage, en effet la taille des particules des polysides insolubles est un critère important de leur dégradation. Plus les fibres sont de dimensions réduites, plus l'hydrolyse est importante.(Moloney et col.1984).

De même les différents traitements thermiques peuvent permettre une dépectinisation presque totale des pulpes et accroître ainsi

l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et des hemicelluloses (Sidi Ali et col.1984).

c. prétraitements enzymatiques

L'action préalable des pectinases permet de dépectiniser les pulpes ce qui a pour effet d'accroître considérablement ensuite le rendement de l'hydrolyse.

Il apparaît donc important d'agir avec des mélanges très complets qui agiront en synergie dans la dégradation de la paroi cellulaire. Il faut tenir compte par ailleurs des effets inhibiteurs qui limitent le rendement de l'hydrolyse. De plus comme dans toutes réactions enzymatiques industrielles, d'autres facteurs autres que les prétraitements peuvent influencer également le rendement de l'hydrolyse, il s'agit de la concentration en enzyme et du rapport (enzyme/substrat).

II. Incidence de la dégradation alcaline sur les pulpes de betteraves

Les pulpes de betterave sucrière constituent un résidu abondant qu'on récupère après l'extraction du saccharose; c'est un matériel qui une fois sèche est utilisé essentiellement pour l'alimentation du bétail (Kelly, 1983). Plusieurs stratégies ont été développées pour la bio-utilisation de ces pulpes, tel que l'enrichissement direct en protéines par des champignons (Illines et Schaffeld, 1982) (Bajon et col. 1985) la digestion anaérobie pour la production de biogaz (Labat et col. 1984) et la saccharification enzymatique

pour la production de sucres fermentescibles (Asenjo et col. 1982) (Sidi Ali et col. 1984).

Les pulpes (tableau 13) sont constituées d'environ 70% de polyosides, formés essentiellement de cellulose, d'hemicelluloses et de pectines.

Composé	pourcentage en poids sec
cellulose	22,9
hemicellulose	49,3
lignine	1,2
protéines	8,2
saccharose	2,1
cendres	3,8
lipides	1,0
pectines et autres polyosides	11,5

Tableau 13 Composition chimique des pulpes de betteraves

D'après Schaffeld, G. et col. 1982)

Nous avons vu précédemment que dans le cas de l'hydrolyse chimique seule l'hydrolyse acide a été vraiment étudiée (Schaffeld et col. 1987), en revanche on pourrait se demander quel pourrait être le résultat d'une hydrolyse alcaline sur les structures polysaccharidiques des pulpes. Cette étude a en effet double but:

- vérifier si une telle hydrolyse pouvait conduire à des résultats industriellement intéressants

- lors du process sucrier normal, il est impossible ou presque d'empêcher après la diffusion le passage de petites quantités de pulpes dans l'épuration calco-carbonique, étape au cours de laquelle le pH dépasse la valeur de 12.

Il est donc intéressant d'étudier le devenir des différents structures polysaccharidiques de la pulpe au cours d'un tel traitement à pH élevé, et ainsi de vérifier si certaines des structures macromoléculaires mises en évidence dans les jus sucrés ne proviennent pas d'une solubilisation des polysaccharides de la betterave.

II.1. Hydrolyse basique des pulpes de betteraves sucrière.

Lors de cette étude nous avons essayé d'étudier la cinétique de la dégradation en milieu alcalin des pulpes de betteraves en fonction du pH. Ces essais ont porté sur des échantillons de pulpes séchées par lyophilisation. Une étude préalable nous a montré que le traitement des pulpes en milieu basique entraînait une diminution du pH du milieu ce qui mettait donc en évidence la libération d'acides au cours de cette dégradation. Cette constatation nous a permis de suivre la cinétique de libération d'acides au

pH-mètre. A 15 g de pulpes sèches on ajoute 200ml d'eau le tout étant maintenu dans un bain marie à une température de 60°C. Toutes les dix minutes on ajoute à l'aide d'une burette automatique le volume de soude 1N nécessaire pour maintenir le pH à la valeur de consigne fixée. Après plusieurs essais, nous avons finalement utilisé quatre valeurs de pH de consigne: 8,5, 9,5, 10,2 et 11. Les hydrolyses ont toutes été arrêtées au bout de 200 minutes de réaction. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 62.

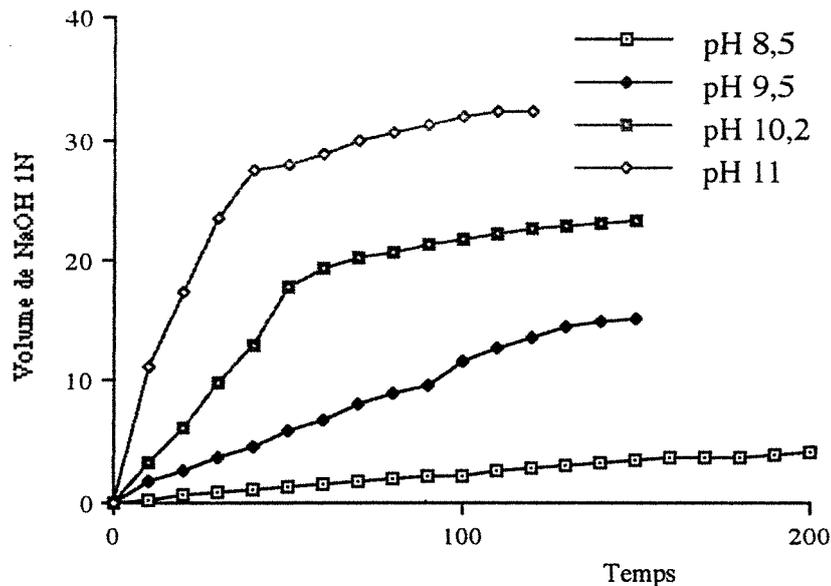


Figure 62: cinétique de la dégradation alcaline

Ces résultats nous montrent bien que la dégradation s'accompagne d'une libération de protons dans le milieu, d'autant plus importante que le pH de consigne est élevé. Le tableau 14 traduit l'évolution de la demande en soude nécessaire pour maintenir les pH de consigne pendant 200 minutes.

pH	8,5	9,5	10,2	11
Volume de NaOH 1N (ml)	4,15	15,23	23,25	32,40

Tableau 14 Volumes totaux de NaOH 1N consommés au cours des différentes dégradations

On remarque que l'augmentation de la concentration en OH^- entraîne bien une augmentation de la demande en soude pour maintenir un pH de consigne de plus en plus élevé, ce qui traduit une augmentation de la dégradation des structures polyosidiques de l'échantillon. On notera que quand on affiche un pH de consigne de 11, au cours de toute la dégradation, on multiplie par 8 (par rapport à la manipulation à pH 8,5) la consommation de soude, ce qui correspond à la libération d'autant d'acides organiques dans le milieu.

II.2. Détermination des poids secs après dégradation basique

Des lors que le traitement alcalin permettait d'affirmer que les structures polyosidiques étaient attaquées, il était important de rechercher qu'elles étaient les structures macromoléculaires touchées par la dégradation. Les pulpes après dégradation sont filtrées puis rincées à l'eau

distillée. Les filtrats obtenus sont analysés par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Visible (Figure 63).

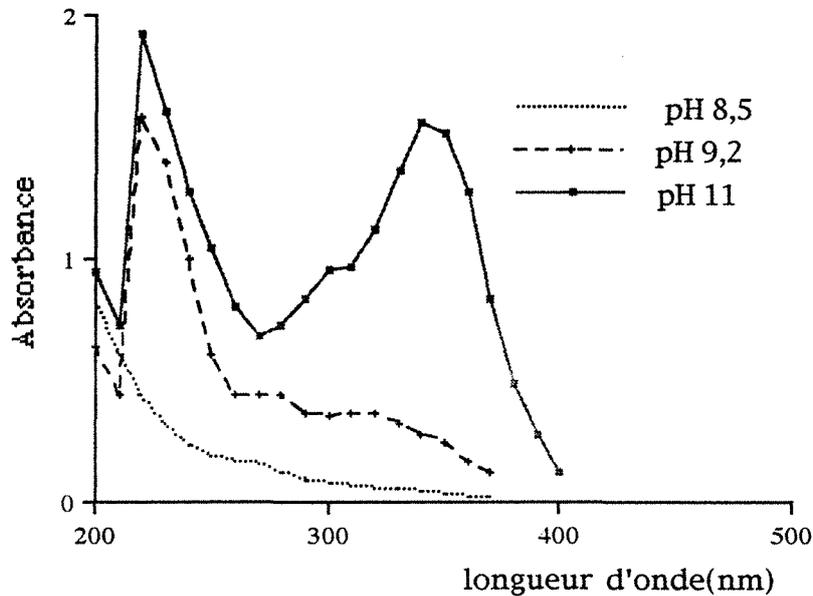


Figure 63: Spectre UV-visible des filtrats issus de la dégradation alcaline à trois pH.(8,5, 9,5 et 11)

Ces spectres montrent l'apparition de bandes d'absorption nouvelles au fur et à mesure que la dégradation se développe, notamment une bande à 216 nm et une autre à 345 nm alors qu'un épaulement apparaît vers 280 nm. Ceci s'explique par les modifications de structures moléculaires au cours de la dégradation en milieu basique. Cette modification du spectre d'absorption des produits de dégradation met en évidence notamment la manipulation du processus de β -élimination imputable aux structures pectiques (216 nm). L'épaulement à 280 nm (pH 9,2) et surtout l'absorption à 345 nm (pH 11) pourrait provenir des groupements féruliques démasqués par le traitement.

Les poids secs correspondant aux différents filtrats, obtenus à des pH de consigne plus élevés sont plus abondants que ceux obtenus à des pH plus bas comme le montre le tableau 15.

pH	8,5	9,5	10,2	11
Extraits secs des filtrats (g)	1,98	3,27	3,95	4,95
Résidu (g)	12,99	11,65	10,91	9,95
Total (g)	14,97	14,92	14,86	14,90

Tableau 15 : Poids secs (en g) des filtrats et des résidus issus de la dégradation alcaline des pulpes

II.3. Dosage des sucres totaux et acides uroniques dans les filtrats

Les méthodes utilisées sont d'abord la méthode phénol-acide sulfurique (Dubois 1956) pour les sucres totaux et la méthode au méta-hydroxy-diphényl (MHDP) pour les acides uroniques (Matériel et Méthodes).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 16. On notera donc que plus le milieu est basique et plus le pourcentage d'acides uroniques libérés est important et passe de 20 à 60% des sucres totaux. Ceci signifie que les composés qui renferment dans leurs structures des acides

uroniques, tels que pectines ou à un degré moindre hemicelluloses subissent une dégradation importante

pH	8,5	9,5	10,2	11
Filtrat (1)	13,2	21,8	26,33	33,00
Sucres totaux des filtrats(1)	1,50	3,12	4,21	5,94
Acides uroniques des filtrats (1)	0,3	1,25	2,1	3,6
ac.uroniques/ sucres totaux	0,2	0,4	0,5	0,6

(1) % en g pour 100g de pulpes initiales sèches

Tableau 16: Teneur en sucres totaux et en acides uroniques des filtrats issus de la dégradation basique

Pour connaître la nature des transformations opérés, il était nécessaire de caractériser par l'analyse les structures des polyosides résiduels

II.4. Fractionnement des résidus secs

Les résidus secs récupérés après la dégradation ont subi un fractionnement selon le schéma suivant:

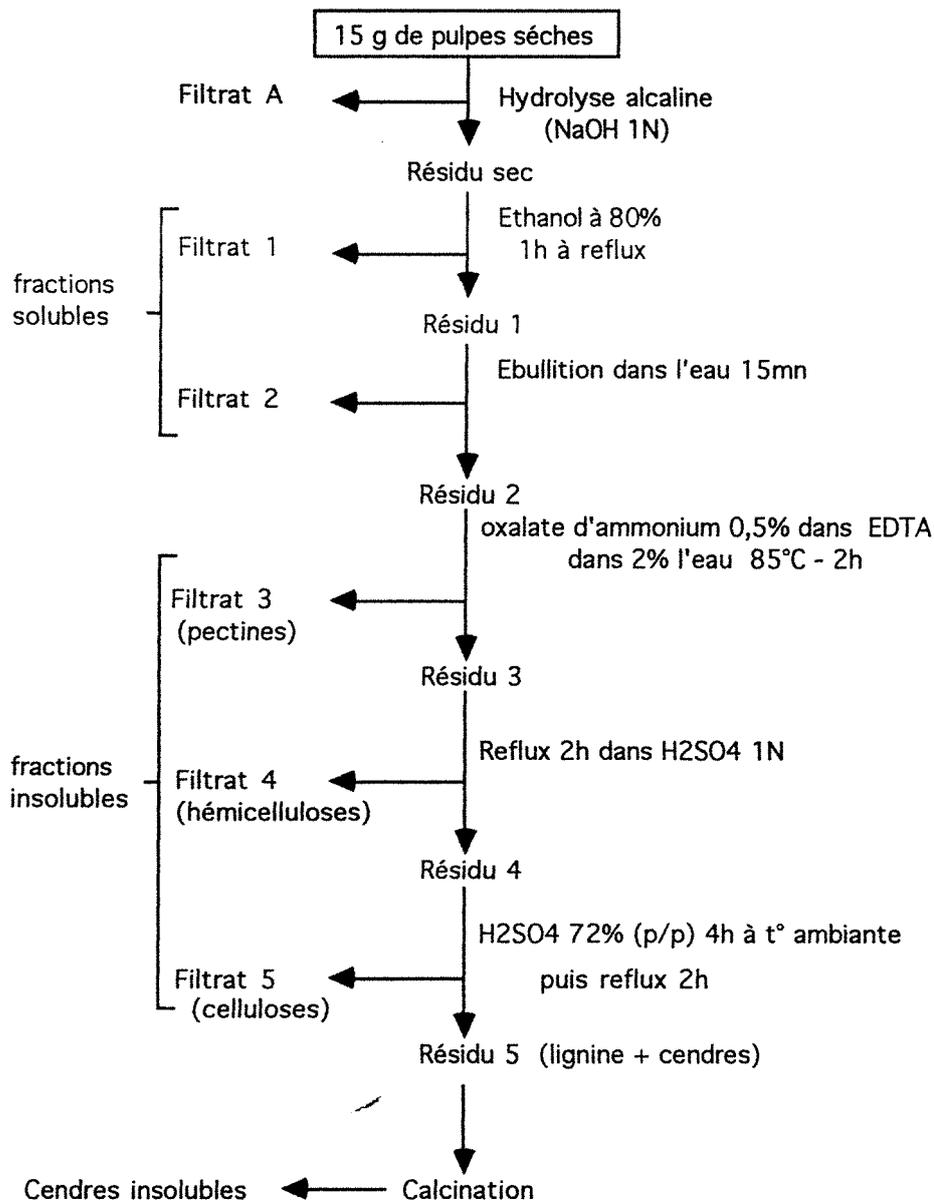


Figure 64: Schéma général de fractionnement des fractions solubles et insolubles des résidus secs issus de la dégradation alcaline des pulpes

Cette méthode décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes est une des méthodes classiques d'analyse des fibres alimentaires. C'est une méthode gravimétrique dont le principe est d'extraire successivement les différents polysides à l'aide de "solvants spécifiques". On se contente alors, après rinçage abondant, de peser les résidus secs. Les filtrats 1 et 2 représentent la fraction soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 80% est constituée essentiellement de sucres simples et à un moindre degré de sels, lipides,.. . Les fractions 3, 4 et 5 représentent les fraction insolubles qui correspondent respectivement aux substances pectiques extraites par l'oxalate d'ammonium, aux hémicelluloses extraites par l'acide sulfurique 1N et à la cellulose extraite par l'acide sulfurique à 72% (p/p).

Les résultats de ce fractionnement sont regroupés dans le tableau 17. Ces résultats montrent d'une manière non équivoque et confirment les résultats préliminaires à savoir que la dégradation est d'autant plus importante que le pH est élevé. Ainsi pour un pH de 8,5 après hydrolyse il reste 9,1% de constituants solubles dans l'éthanol à 80% dans le résidu sec, alors il n'en reste que 6,8% à pH 9,5 et 2,1% à pH 11. En ce qui concerne les fractions insolubles les substances pectiques représentent les constituants les plus marquées par cette dégradation (-40%). Ceci confirme les résultats obtenus auparavant concernant les acides uroniques. Ainsi on passe à pH 8,5 de 10,1% de pectines qui résistent à la dégradation, à 5,6% à pH 11 (-40%). Les hémicelluloses (-7,5%) et la cellulose (-20%) sont plus faiblement dégradées et résistent mieux que les substances pectiques à la dégradation basique.

On peut dès lors penser que les effets de l'épuration et de l'alcanité des jus sucrés qui en résultent sont en grande partie responsables de la dégradation des pectines. En revanche il est probable qu'une partie des

hémicelluloses dont certaines sont solubles en milieu basique (hémicelluloses A) échappent partiellement aux effets de l'épuration et peuvent se retrouver associées à la cristallisation du saccharose.

pH	8,5	9,5	10,2	11
Fractions solubles (a) (%)(filtrats 1+2)	9,1	6,8	6,1	2,1
Fractions insolubles (b) (%)(filtrats 3, 4 et 5)	74,8	69,6	66,3	63,5
Substances pectiques	10,1	7,7	6,6	5,9
Hémicelluloses	42,8	41,0	40,0	40,0
Cellulose	20,1	18,9	17,9	16,0
Lignine	2,9	1,4	0,9	1,0
Sels minéraux	1,9	1,9	1,8	1,8
Total (a+b)	83,9	76,4	72,4	65,6

Tableau 17: Détermination des fractions solubles et insolubles des résidus d'extraction alcaline en fonction du pH de consigne.

(tous les résultats sont exprimés en g pour 100g de pulpes sèches initiales avant le traitement alcalin)

II.5. Conclusion

Il est clair d'après ces résultats que la dégradation basique est une dégradation plus douce que celle opérée en milieu acide surtout lorsque on étudie les travaux effectués par Schaffeld. et col. (1987). Ces auteurs ont fait subir aux pulpes de betteraves une attaque acide et ont trouvé que 55,2% de matériel est dégradé et que les hémicelluloses sont les plus touchées. Par contre lors de la dégradation basique nous n'avons pu dégrader en 200 minutes que 34,4% des pulpes (essentiellement des pectines -40% et de façon plus étonnante la cellulose, en revanche les hémicelluloses résistent bien à cette dégradation).

Nous pensons que ces résultats sont intéressants surtout si on les place dans le contexte général du process sucrier. Il ne faut pas perdre de vue en effet que les pulpes sont récupérées après extraction du saccharose à partir d'un milieu dont le pH est normalement voisin de 7,5. Des pulpes ont peu de chance d'être entraînées dans les jus de diffusion d'autre part au moment de l'épuration le pH passe de 8 (préchauffage) à 12 (chauffage). A ce pH les pulpes et les polysaccharides solubles entraînées vont subir une dégradation alcaline. Il va y avoir libération dans le milieu si l'épuration est incomplète de produits de dégradation essentiellement issus de pectines mais aussi des hémicelluloses. Une partie de ces produits de dégradation peut échapper au processus d'épuration. Ils ont dès lors toutes chances de se retrouver dans les sirops et autres jus sucrés avec les problèmes et les conséquences que cela peut entraîner pour la qualité des sucres.

III. Valorisation des pulpes sous forme de fibres alimentaires

Nous avons vu dans l'introduction de ce troisième chapitre que les pulpes de betterave renferment une teneur importante en fibres alimentaires, et présentent par conséquent un intérêt économique. Cependant, ces pulpes sont colorées (de couleur grise à l'état sec, elle évoluent vers le brun foncé en milieu aqueux). Cette coloration est due aux réactions d'oxydation des groupements phénoliques associés ou adsorbés sur les pulpes. Cette coloration pose un problème quand on veut les inclure dans des préparations alimentaires. Il est donc absolument nécessaire de les décolorer par un traitement chimique le moins onéreux possible.

III.1. Décoloration des pulpes de betterave

Pour décolorer les pulpes de betteraves deux traitements ont été proposés, l'un faisant appel au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'autre à l'Ozone (O_3). Une étude préalable a permis de montrer que dans certaines conditions, ces procédés conduisent tous les deux à d'excellents résultats. Cependant l'ozonolyse présente un inconvénient majeur, elle nécessite la mise en place de systèmes générateurs d'ozone d'où des coûts d'investissement et de fonctionnement certainement importants. C'est la raison pour laquelle l'utilisation du peroxyde d'hydrogène nous a semblé nettement préférable.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer:

- l'influence de certains paramètres tels que le pH, la température et le temps de réaction.

- le devenir de certains constituants de la pulpe comme la lignine et la cellulose.
- la concentration optimale en H_2O_2 à utiliser
- les moyens de doser et d'éliminer dans la pulpe traitée le peroxyde d'hydrogène résiduel.

III.1.1 Influence du pH

Le pH a une influence déterminante sur la décoloration des pulpes par H_2O_2 . En effet des essais systématiques à différents pH ont montré qu'en milieu acide ou neutre, la décoloration est très lente surtout pour des concentrations faibles en H_2O_2 . L'addition de certains catalyseurs tels que le fer ou le manganèse n'entraîne pas d'améliorations suffisantes pas plus que le rayonnement ultraviolet. Par contre, les pH alcalins qui accélèrent la décomposition du peroxyde d'hydrogène provoquent une décoloration plus rapide des pulpes.

Il faut noter que l'attaque des pulpes par H_2O_2 se traduit par une libération d'acides dans le milieu réactionnel avec abaissement rapide du pH comme l'illustre la figure 65.

Dans les conditions de l'expérience, on constate qu'en une heure le pH passe de 9 à 7,5. L'action d' H_2O_2 étant maximale en milieu alcalin, il est clair que si l'on voulait maintenir constante la vitesse de décoloration, il faudrait en toute rigueur faire appel à une régulation du pH. En fait, on peut se contenter plus simplement d'alcaliniser suffisamment le milieu de départ (avec NaOH par exemple) entre 9 et 10 pour obtenir un résultat satisfaisant.

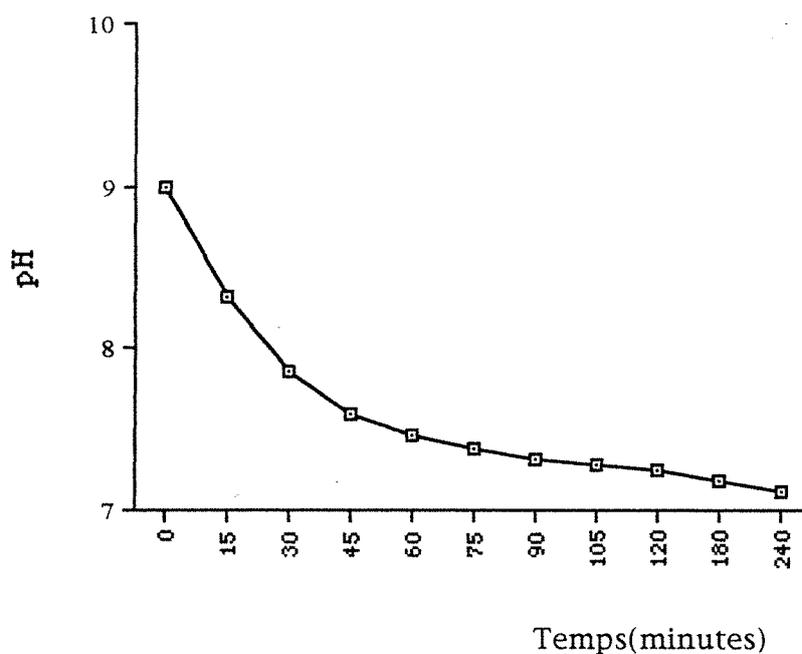


Figure 65: Evolution du pH d'une solution d' H_2O_2 à 0.5% (pH=9) contenant 2g de pulpes

La décoloration en milieu basique présente l'inconvénient de conduire à des pulpes très jaunes. Cependant, celles-ci peuvent être facilement blanchies en procédant à la fin de la réaction à un lavage à l'eau acidifiée (pH=3 environ).

III.1.2. Evolution des teneurs en cellulose et en lignine dans les pulpes décolorées

Il s'agit ici d'étudier l'influence des concentrations en H_2O_2 utilisées et de la durée de la réaction sur les teneurs en lignine et en cellulose dans la pulpe décolorée. Toutes les expériences ont été effectuées à

20°C avec trois concentrations différentes en H_2O_2 , en utilisant de la pulpe séchée:

a- 0,2 g d' H_2O_2 /g de pulpe séchée

b- 0,1g d' H_2O_2 /g de pulpe séchée

c- 0,05g d' H_2O_2 /g de pulpe séchée

Nous avons rassemblé l'essentiel des résultats dans le tableau 18. Les teneurs en cellulose et en lignine sont exprimées en g pour 100g de pulpe résiduelle après traitement par H_2O_2 , ainsi que ces même teneurs calculées par rapport à 100g de matière sèche de départ. Le pourcentage de perte de poids est également indiqué

Ces résultats montrent qu'en 24 heures quelle que soit la concentration en H_2O_2 utilisée, il y a solubilisation d'environ 18% de la pulpe traitée mais cette perte de poids ne se fait pas aux dépens de la cellulose et de la lignine, mais vraisemblablement aux dépens des pectines et des hémicelluloses.

III.1.3. Conditions optimales de décoloration des pulpes

L'ensemble des manipulations qui ont été réalisé à température ambiante, à différentes concentrations en H_2O_2 et pour différents temps de réactions, permet logiquement de conclure que la décoloration des pulpes est directement proportionnelle à la quantité de peroxyde de l'hydrogène mis en jeu et à la durée du traitement.

Pour des concentrations importantes (1g d' H_2O_2 /g de matière sèche) on obtient une très bonne décoloration en deux heures. Un résultat à

Temps en jours	0,05g d'H ₂ O ₂ /g de pulpe 28					0,1gd'H ₂ O ₂ /g de pulpe					0,2g d'H ₂ O ₂ /g de pulpe				
	CELLULOSE		LIGNINE		Perte de poids (%)	CELLULOSE		LIGNINE		Perte de poids (%)	CELLULOSE		LIGNINE		Perte de poids (%)
	Pulpe décolorée	Pulpe initiale	Pulpe décolorée	Pulpe initiale		Pulpe décolorée	Pulpe initiale	Pulpe décolorée	Pulpe initiale		Pulpe décolorée	Pulpe initiale	Pulpe décolorée	Pulpe initiale	
1	25,1	21	5,5	4,4	18,7	25,5	21	5,8	4,8	17,6	24,9	21	6	4,9	18,7
2	27,4	21	5,5	4,2	23,4	25,1	20	5,3	4,1	21,8	29,7	23	5,8	4,5	21,7
3	30,2	24	-	-	20,1	28,1	22	6,3	4,5	22,2	32,8	24	5,8	4,3	25,7
4	33,9	25	-	-	22,8	34,8	25	6,2	4,4	28	32,7	22	-	-	-
5	36,9	26	5,8	4,2	27	-	-	6,2	4,4	28,2	33,3	23	7,1	5	30,2
6	-	-	5,9	4,2	27,4	35,8	25	6,2	4,4	28,7	37,1	25	6,4	4	36,2

Tableau 18: Evolution des teneurs en cellulose et en lignine dans les pulpes
décolorées

peu près comparable peut être obtenu avec des teneurs beaucoup plus faibles, de l'ordre de 0,05g d'H₂O₂/g de matière sèche en prolongeant le temps de contact pendant plusieurs jours (5 à 6). Cette dernière concentration semble être d'ailleurs la limite inférieure en dessous de laquelle il ne faut pas descendre.

D'un point de vue industriel, ces conditions extrêmes sont peu intéressantes car dans un cas la quantité d'H₂O₂ utilisée est trop importante et dans l'autre la durée du traitement beaucoup trop longue. Pour diminuer conjointement ces deux facteurs (concentration en H₂O₂ et temps de réaction) la solution la plus simple consiste à réaliser la décoloration des à des températures plus élevées que la température ambiante. Effectivement on constate qu'en portant le milieu réactionnel à des températures comprises entre 40 et 60°C, on peut obtenir une décoloration importante des pulpes en trois heures avec des teneurs en H₂O₂ de l'ordre de 0,2 à 0,25g/g de matière sèche. la perte de poids est environ de 20% dans ces conditions.

Nous précisons qu'il est difficile pour l'instant de fixer avec plus de précisions les valeurs optimales de la température, de la durée de la réaction et de la concentration en H₂O₂ à utiliser dans la mesure où nous ne nous sommes pas fixés une couleur de référence pour la pulpe décolorée.

III.1.4. Dosage du peroxyde d'hydrogène.

Pour déterminer la quantité d'H₂O₂ consommée au cours de la décoloration et la quantité résiduelle dans la pulpe traitée et séchée (dans les conditions définies ci-dessus), l'expérience suivante a été effectuée:

3 Kg de pulpe humide (600g de matière sèche) ont été recouverts avec 11 litres d'une solution d' H_2O_2 à 1,36% soit 0,25g d' H_2O_2 /g de matière sèche. Après 3 heures sous agitation à 40°C, la pulpe a été essorée. On récupère de cette manière 8 litres de milieu. La pulpe décolorée a ensuite été lavée en une fois avec 15 litres d'eau acidifiée, puis à nouveau essorée et séchée. La quantité résiduelle de matière sèche est dans ces conditions de 480g.

Sur les pulpes décolorées obtenues nous avons déterminé les teneurs en fibres alimentaires selon la méthode de Van soest (Réf AOAC) le tableau 19 donne les résultats de cette détermination:

Fibres au détergent neutre (cellulose, hemicellulose, lignine et cendres)	61,8 %
Fibres au détergent acide (cellulose, lignine et cendres)	28,3 %

Tableau 19: teneur en fibres alimentaires en g pour 100g de pulpes décolorées sèches.

Les teneurs en peroxyde d'hydrogène ont ensuite été déterminées dans le milieu réactionnel après décoloration, dans les eaux de lavage et dans la pulpe décolorée et séchée. H_2O_2 a été dosé ici par potentiométrie en utilisant l'hydrosulfite de sodium ($NaHSO_3$) comme réducteur: On enregistre les résultats suivants:

Milieu de départ	150 g H ₂ O ₂
Milieu réactionnel après élimination de la pulpe décolorée	71,4 g H ₂ O ₂
Eau de lavage	37,4 g H ₂ O ₂
Pulpe décolorée séchée	9,6 g H ₂ O ₂

Tableau 20: Consommation de peroxyde d'hydrogène lors de la décoloration des pulpes.

Ces résultats permettent de conclure que 31,6 g d'H₂O₂ ont été consommés soit 0,05g par g de matière sèche à décolorer. Le 1/5 seulement du peroxyde a été utilisé; on peut donc tout à fait envisager de se servir à nouveau de cette solution (après ajustement de la concentration) pour procéder à une nouvelle décoloration.

La pulpe décolorée contient encore des quantités importante d'H₂O₂ (environ 2% que ni le lavage ni le séchage n'ont permis d'éliminer.

III.1.5. Elimination du peroxyde d'hydrogène résiduel dans la pulpe décolorée

Il est indispensable que la pulpe décolorée soit exempte de peroxyde d'hydrogène, surtout si cette pulpe est destinée à l'alimentation humaine. On peut envisager plusieurs moyens pour éliminer le peroxyde d'hydrogène.

a. par lavage à l'eau:

L'expérience précédente a montré qu'un seul lavage à l'eau ne permettait pas d'éliminer totalement l' H_2O_2 résiduel. Toutefois il faut souligner que dans cet essai la pulpe avait été simplement essorée car le laboratoire ne dispose pas de presse. Dès lors on peut penser qu'avec un pressage efficace de la pulpe, on diminuerait très fortement le peroxyde résiduel et que dans ces conditions un ou deux lavages à l'eau pourraient être suffisants.

Cette solution simple présente cependant l'inconvénient de mettre en jeu des volumes d'eau importants qu'il sera difficile de rejeter à l'égout sans en éliminer le peroxyde d'hydrogène.

**b. par traitement à l'hydrogénosulfite de sodium
($NaHSO_3$)**

Le peroxyde d'hydrogène réagit d'une façon stoechiométrique avec $NaHSO_3$ avec formation de sulfates solubles peu gênants. D'un point de vue industriel, l'addition de la quantité de $NaHSO_3$ juste nécessaire à la destruction du peroxyde d'hydrogène résiduel peut s'automatiser sans grande difficulté; cependant la réglementation actuelle, interdit tout excès de SO_2

c par traitement à la catalase

La catalase est une enzyme qui détruit quantitativement le peroxyde d'hydrogène à condition que la concentration en H_2O_2 soit inférieure à 0,2 molaire et que le pH soit voisin de la neutralité. Il existe sur le marché des catalases à très forte activité spécifique et à des prix relativement bas. Par exemple SERVA commercialise une catalase (de foie de boeuf) présentant une activité spécifique de 200.000 U/ml de solution protéique, c'est à dire qu'un ml d'extrait enzymatique détruit 0,2 mole d' H_2O_2 par minute. Les quantités à utiliser sont tellement faibles que l'utilisation de cette enzyme n'entraînerait qu'une augmentation très minime du prix de revient de la pulpe décolorée. Elle présente par contre le gros avantage de détruire H_2O_2 sans laisser de résidus gênants

III.1.6. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que le peroxyde d'hydrogène est tout à fait efficace pour décolorer les pulpes de betteraves. La décoloration est directement proportionnelle à la concentration en peroxyde, à la température et à la durée de la réaction.

Dans l'état actuel des résultats et compte tenu des réserves exprimées précédemment les conditions optimales du traitement préconisé sont les suivantes:

- | | |
|-----------------|------------------------------|
| - concentration | 0,2 g d' H_2O_2 /g de M.S. |
| - pH du milieu | 9 à 10 |
| - température | entre 40 et 60°C |

- durée de la réaction 2 à 3 heures
- lavage de la pulpe décolorée à l'eau acidifiée à pH=3

Il faut noter que la concentration en peroxyde pourrait être abaissée (1/5 seulement est consommé). En effet, toutes les expériences ont été réalisées ici par immersion complète des pulpes d'où l'utilisation de volumes importants d' H_2O_2 . Il est tout à fait probable qu'en procédant au malaxage des pulpes, on doit pouvoir obtenir une décoloration comparable avec des quantités de peroxyde beaucoup plus faibles.

Dans les conditions définies ci-dessus, la perte en matière sèche se situe aux environs de 20% mais cette perte ne se fait pas au détriment de la lignine ou de la cellulose, mais vraisemblablement aux dépens des pectines et des hémicelluloses.

Après traitement, la pulpe blanchie contient du peroxyde d'hydrogène qu'un simple séchage ne permet pas d'éliminer. Il peut être cependant détruit totalement enzymatiquement par la catalase ou éventuellement par des lavages répétés à l'eau.

III.2. Etude physico-chimique des pulpes blanchies

Nous avons donc répondu à la première partie du problème, les pulpes sont décolorées. Il est cependant intéressant d'aborder l'étude physico-chimique de ces pulpes blanchies afin de comparer leurs propriétés à celles des pulpes avant tout traitement.

III.2.1. Etude du gonflement lors de la mise en contact avec l'eau.

L'échantillon à étudier a été dispersé préalablement dans du pétrole lampant, et ceci pour éviter toute erreur due à la présence de l'air occlus. Les résultats obtenus sont rapportés à 1 gramme de pulpes séchées dans le tableau 21. Ces résultats montrent d'une manière très claire que le traitement de blanchissement renforce la capacité de gonflement de pulpes d'environ 20%.

	augmentation du volume*
pulpe brute	5,35 ml
pulpe blanchie	6,45 ml

* augmentation du volume = volume des pulpes après gonflement - volume des pulpes en présence de pétrole

Tableau 21: Etude du gonflement des pulpes blanchies(en ml par g de pulpe)

III.2. 2. Rétention des cations métalliques par la pulpe.

Ce sont les groupements -COOH libres qui sont les principaux responsables de la rétention des cations métalliques. La fixation de ces cations s'accompagne le plus souvent de la libération d'un ou de deux H⁺

selon la valence de l'ion métallique. Il est donc possible de suivre la fixation de ces cations au pHstat afin de quantifier la libération des H^+ par neutralisation à l'aide d'une base. On remarque généralement que la fixation des métaux s'effectue en deux étapes:

- la première est très rapide (quelques minutes), elle permet d'échanger une quantité relativement importante de cations.

- la seconde très lente, se prolonge dans le temps.

Nous avons donc effectué deux types d'expérimentations:

- la première a porté uniquement sur la première étape et a permis d'étudier la rétention des ions Ca^{++}

- la seconde avec une durée de réaction beaucoup plus longue (24 heures) a été effectuée avec du cuivre.

a. rétention des ions Ca^{++}

Le calcium est apporté au milieu sous forme d'acétate 0,05M (pH 7,1). Le pHstat est réglé au pH de la solution d'acétate de calcium soit 7,1, les ions H^+ libérés sont neutralisés pendant 6 heures par une solution de NaOH 0,05M. Les pulpes brutes ou blanchies doivent être lavées à l'eau distillée avant d'être mises en contact avec la solution d'acétate de calcium. Le tableau 22 illustre les résultats obtenus:

	Volume de NaOH (0,05M)(en ml)	rétention de Ca ⁺⁺ *
Pulpe brute	1,12	2,8
Pulpe blanchie	2,6	6,5

(* en m mole de Ca⁺⁺/100g de pulpe)

Tableau 22: Rétention des ions calcium par les pulpes de betterave

Ces résultats nous montrent que le traitement appliqué aux pulpes en vue de les décolorer, augmente considérablement la fixation des ions calcium. Ainsi on passe d'un taux de rétention de 2,8 mmoles de calcium pour 100g de pulpes brutes à un taux de rétention de 6,5 mmoles de calcium pour 100g de pulpes blanchies.

b.. rétention des ions Cu⁺⁺.

Comme pour le calcium le cuivre est apporté au milieu sous forme de CuCl₂ (0,04M) en large excès (75ml), le pH est ajusté au pH de la solution de CuCl₂ (pH 5). Nous avons suivi au pHstat (pH 5) pendant 24 heures, la libération des ions H⁺ par neutralisation avec une solution de KOH (0,085M). Les résultats obtenus sont enregistrés dans le tableau 23:

	volume de KOH (0,085M)(en ml)	rétention de Cu ⁺⁺ *
pulpe brute	3,5	15
pulpe blanchie	4,75	20,3

(*en m mole de Cu⁺⁺/100g de pulpe)

Tableau 23: Pourcentage de rétention des ions Cu⁺⁺ par les pulpes brutes et blanchies

Là encore on note une augmentation de la rétention du cuivre elle atteint 36% après blanchissement. Cependant, cette forte rétention des ions cuivre par rapport aux ions calcium s'explique certainement par une chélation du cuivre par d'autres sites complémentaires des COOH libres.

En conclusion, dans tous les cas étudiés, on note une forte augmentation de la rétention des ions métalliques par la pulpe blanchie.

III.3. Dosage chimique des -COOH totaux

Les expériences de fixation des cations métalliques ne nous ont pas permis de savoir avec exactitude si le blanchissement modifiait vraiment la teneur en -COOH libres totaux. Pour procéder à leur détermination nous soumettons les échantillons de pulpes une fois réduits à l'état pulvérulent à un traitement à reflux après dispersion dans une solution de chlorhydrate de diéthylamine dans le méthanol (Mat & Méth). La pulpe est ensuite lavée

abondamment par un mélange eau distillée et méthanol puis séchée. La pulpe résiduelle une fois séchée on détermine sa teneur en azote soit par KJELDAHL soit par analyse élémentaire.

III.3.1. Dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 24:

	pulpe brute		pulpe blanchie	
	non traitée	traitée	non traitée	traitée
teneur en N(%)	1,62	2,30	1,65	2,18
différence	0 ,67		0 ,53	

Tableau 24: Détermination de la teneur en azote par la méthode KJELDAHL des pulpes brutes et blanchies avant et après traitement au chlorhydrate de diéthylamine

La différence de teneurs en l'azote avant et après traitement avec la solution de chlorhydrate de diéthylamine dans le méthanol et traduisent une diminution peu significatives des -COOH libres lors du blanchissement de la pulpe que l'on pourrait expliquer par une élimination partielle des constituants solubles au cours de ce traitement.

III.3.2. Dosage par analyse élémentaire.

Cette détermination a l'avantage d'être plus précise que la précédente; elle permet de calculer le nombre de -COOH libres par comparaison des teneurs respectives en azote et en carbone des différents échantillons. Les résultats de l'analyse élémentaire du carbone et de l'azote dans les pulpes brute et blanchie, avant et après traitement au chlorhydrate de diéthylamine sont rassemblés dans le tableau 25

	pulpe brute		pulpe blanchie	
	non traitée	traitée	non traitée	traitée
teneur en carbone	42,31	43,15	41,74	42,48
teneur en azote	1,74	2,42	1,59	2,19

Tableau 25 Teneur en carbone et en azote (%) des pulpes brutes et blanchies avant et après traitement au chlorhydrate de diéthylamine

Après avoir effectué les calculs (Mat & Méth) nous avons trouvé pour la pulpe brute 0,112 équivalent pour 100g de pulpe. En ce qui concerne la pulpe blanchie nous avons trouvé 0,108 équivalent pour 100g de pulpe. Ces résultats montrent que la diminution du nombre des -COOH libres après blanchissement de la pulpe, n'est pas significative.

Les résultats de ces expériences donnent lieu à trois remarques:

- les teneurs en azote déterminées par KJELDAHL et par analyse élémentaire sont comparables.

- on note une faible diminution à la fois des teneurs en carbone et en azote lors du blanchissement ce qui correspond vraisemblablement à une perte en fraction polysidique soluble qu'à une modification importante de la structure des fibres résiduelles

- les quantités de cations (Ca^{++} Cu^{++}) fixées, obtenues au cours des analyses précédentes restent très inférieures aux teneurs en $-\text{COOH}$ des pulpes déterminées par fixation des cations diéthylamine ce qui pose le problème de leur capacité d'échange.

III.4. Détermination de la capacité d'échange des pulpes.

On considère en effet le plus souvent que les sites d'échanges sont les $-\text{COOH}$ non estérifiés des pectines. De plus les résultats obtenus lors de l'étude de la rétention des cations ne concordent pas bien avec la détermination des $-\text{COOH}$. La méthode développée ici permet en effet de déterminer la fixation du cuivre avant et après saponification des pectines estérifiées (Mat & Méth).

Le tableau 26 illustre les résultats obtenus par cette méthode

	Cuivre avant saponification	Cuivre après saponification
pulpe brute	0,071mole*	0,110 mole*
pulpe blanchie	0,058 mole*	0,103 mole*

(*): Mole de cuivre fixées pour 100g de pulpes

Tableau 26: Détermination du cuivre fixé du cuivre avant et après saponification des pectines estérifiées

On remarquera que cette fois-ci après saponification on trouve les résultats obtenus lors de l'évaluation directe de -COOH totaux et que le blanchissement ne modifie pas la capacité d'échange des cations par les pulpes.

Les résultats du tableau 26 nous permettent de plus de calculer le degré d'estérification (D.E.) des pectines:

$$DE = 1 - \frac{\text{mg Cu lié avant saponification}}{\text{mg Cu lié après saponification}} \times 100$$

La teneur en substances pectiques exprimée en % d'acide galacturonique:

$$\frac{\text{mg Cu fixé après saponification} \times 2 \times 176 \times 100}{63,6 \times \text{mg d'échantillon}}$$

Le tableau 27: rassemble les résultats obtenus:

	D.E.	Substances pectiques totales
pulpe brute	35,4 %	38,9 %
pulpe blanchie	43,5 %	36,3 %

Tableau 27: Degré d'estérification et teneur en substances pectiques

Ces résultats montrent que le blanchissement de la pulpe entraîne donc une faible diminution (2,6%) des substances pectiques totales, et une augmentation du degré d'estérification de 8,1%. Ceci peut être concilié avec le fait que le blanchissement a surtout détruit des pectines non estérifiées. D'autre part le résultat de la détermination chimique des groupements carboxyliques qui traduit une très faible diminution du % des COOH libres au cours du blanchissement va bien dans le même sens. Lors de l'étude directe au pHstat de la fixation des cations nous avons observé une augmentation de leur rétention lors du blanchissement. Cependant on peut voir que les teneurs en -COOH (analyse élémentaire) des pulpes brutes et blanchies sont très voisines, ce qui permet de supposer que d'autres groupements fonctionnels tels que des OH, des NH₂ peuvent participer à la chélation des ions Cu⁺⁺. Néanmoins il est opportun de rappeler que le nombre de COOH libres, reste très excédentaire même dans la pulpe blanchie.

III.5. Détermination des polysaccharides dans les pulpes blanchies

C'est une détermination gravimétrique (Mat & Méth) des pulpes. On y distingue une fraction soluble constituée essentiellement de sucres simples et une fraction insoluble (fibres alimentaires), dans laquelle on rencontre pectines, hémicelluloses, celluloses, lignine et cendres. Les résultats de ce fractionnement sont reportés dans le tableau 28

	pulpe brute	pulpe blanchie
Fraction soluble	25,1	16,7
Fractions insolubles (1+2+3+4)	73,2	83,5
pectines	8,2	11
hémicelluloses	40,5	44,3
cellulose	22,5	26,4
cendres	2	1,8

Tableau 28 : Détermination de la proportion en fractions solubles et insolubles des pulpes brutes et blanchies (en g pour 100g de pulpe sèche).

On remarque d'après ces résultats que le blanchissement des pulpes favorise un enrichissement de la pulpe en fibres alimentaires (83,5%

pour la pulpe blanchie contre 73,2 % pour la pulpe brute. Ainsi on permet d'enrichir de 10,3% la pulpe en fibres alimentaires.

III.6. Identification et teneurs en lipides.

III.6.1. Lipides totaux

L'extraction des lipides a été réalisée par un mélange acétate d'éthyle, éther de pétrole(1/1) (v/v). Le solvant est éliminé par évaporation à sec puis on pèse le résidu. Cet extraction nous a fourni 1,78% (p/p) de lipides pour la pulpe brute et 1,30% (p/p) pour la pulpe blanchie. On remarque donc que la teneur en lipides diminue lors du blanchissement.

Cependant cette teneur en lipides de la pulpe blanchie bien que faible n'est pas négligeable vis à vis de l'autoxydation possible, au cours du stockage ,surtout si les lipides insaturées y sont prédominants.

III.6.2. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons donc réalisé une analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits lipidiques après leurs transésterification en esters méthyliques. Les résultat de cette analyse chromatographique sont reportés dans le tableau 29. On note que des acides gras insaturés subsistent même dans les pulpes blanchies. Ainsi pour 100g d'acides gras la proportion de

C_{18:1} augmente notablement, ce qui indique qu'il est moins "détruit" que les autres acides gras.

Cette analyse met en évidence qu'il faut absolument détruire le peroxyde d'hydrogène résiduel dans la pulpe blanchie, ce qui impose *de facto* le traitement par la catalase.

Acides gras	pulpe brute (% relatif)(*)	pulpe blanchie (% relatif)(*)
C 14:0	2,0	2,1
C 14:1	0,8	0,5
C 16:0	51,2	49,1
C 16:1	1,6	0,8
C 18:0	8,4	6,8
C 18:1	16,0	25,1
C 18:2	20,0	15,7

(*): en g pour 100g d'acides gras extraits

Tableau 29: Pourcentage relatif des acides gras issu de l'analyse par CPG des pulpes

III.7. Influence des fibres sur l'activité lipasique

Les fibres alimentaires semblent exercer un rôle bénéfique sur le métabolisme des lipides, en particulier puisque ces fibres ont la propriété de fixer des lipides, on pouvait se demander si l'utilisation de pulpes, brutes ou blanchies, dans la ration pouvait avoir un rôle sur la digestion des lipides et en particulier sur l'activité lipasique.

Le principe est de mettre en contact les fibres avec de l'huile d'olive vierge (à 37°) puis après une heure de contact on ajoute au milieu des sels biliaires pour émulsifier les lipides, le milieu est alors agité puis on ajoute la lipase.

L'activité lipasique libre des acides gras, elle sera donc suivie au pHstat en utilisant de la soude 0,005M pour maintenir le pH à la neutralité. On comparera les résultats obtenus à ceux de l'activité lipasique de la même enzyme travaillant dans les mêmes conditions mais en l'absence des fibres.

La libération de H^+ à partir des lipides contenus dans les échantillons de pulpes permet d'expliquer que les courbes correspondant aux pulpes brutes et blanchies soient au-dessus de la courbe témoin (pendant les premières six ou huit minutes)(Figure 66). En revanche le graphe montre que les pulpes ralentissent l'activité lipasique et que ce ralentissement est plus important dans le cas de la pulpe brute.

Il n'est cependant pas possible de confirmer à l'aide de ce type d'expérimentation si l'inhibition est due à une fixation plus importante des lipides sur les fibres ou à la diminution de l'activité lipasique proprement dite. Nous avons pour cela estimé dans une deuxième série d'expériences la capacité de rétention des lipides par les fibres. On disperse ensemble pulpe et huile d'olive (3g de pulpe + 30ml d'émulsion (huile d'olive et sels biliaires), le

contact est maintenu pendant 2 heures); après filtration, on lave abondamment les échantillons à l'eau, on les sèche, puis on les pèse et on les soumet à une extraction à l'éther de pétrole. On renouvelle les opérations de séchage jusqu'à poids constant. On obtient une rétention de 216mg d'huile/g de pulpe brute et une rétention de 222mg d'huile/g de pulpe blanchie. Il n'y a donc pas de différence significative entre les capacité de rétention des lipides par les deux catégories de fibres, les différences observées dans la détermination de l'activité lipasique sont bien le fait de l'inhibition de cette activité enzymatique.

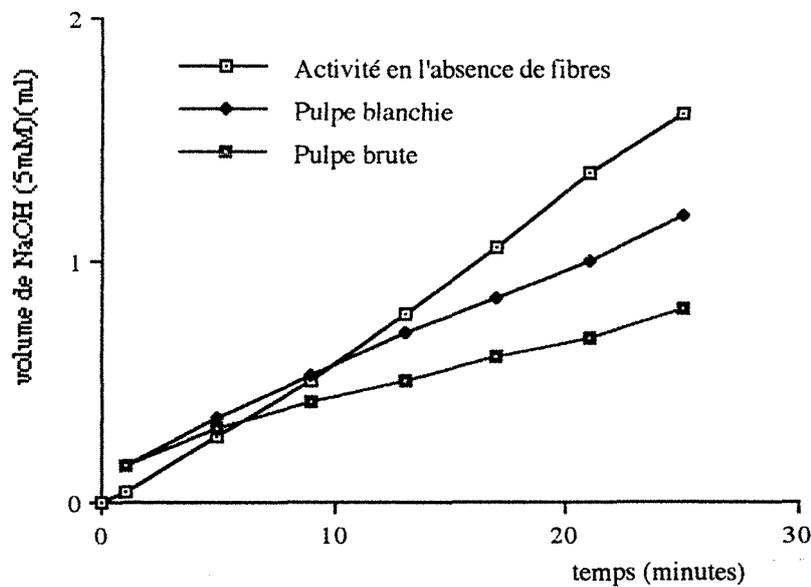


Figure 66 : Influence des fibres sur l'activité lipasique

III.8. Pulpes micronisées de betterave

Dans cet étude, nous avons passé en revue un certains nombre de propriétés physico-chimiques des pulpes brutes. Ces essais ont porté sur

des échantillons non blanchis mais micronisés industriellement (160, 80 et 40 μm) qui nous ont été fournis par la générale Sucrière.

On pouvait en effet penser que la taille des particules influence directement les propriétés physico-chimiques de ce matériel et en particulier la teneur en eau, le pouvoir gonflant et la masse spécifique. On notera que les lots micronisés qui nous ont été fournis avaient une odeur très désagréable de rance. Cette odeur n'est en revanche perceptible dans les lots de pulpes brutes non broyées. L'autoxydation des lipides présents dans la pulpe est donc facilitée par le broyage. Nous pensons qu'une simple délipidation permet d'arriver à un matériel homogène dont on peut aisément déterminer les propriétés fonctionnelles.

III.8.1. Matière sèche des pulpes micronisées

Nous avons pris comme référence le lot de pulpes brutes qui nous a servi lors des précédents travaux. Ces pulpes ont été conservées à la température ambiante en sac plastique, soigneusement refermé après chaque prélèvement. De même, après leur réception, les différents échantillons de pulpes micronisées ont été conservés dans leurs boîtes métalliques d'origine, maintenues rigoureusement fermées.

La méthode utilisée pour la détermination de la matière sèche consiste à maintenir les échantillons pendant 3 heures à 110°C. La micronisation, comme on pouvait s'y attendre, entraîne un dessèchement du produit. Cependant, on remarque que plus le broyage est fin et plus les pulpes reprennent vite l'humidité. Tous les résultats qui suivent sont calculés d'après la teneur en matière sèche du lot correspondant et sont la moyenne d'au moins trois déterminations.

Echantillons	Teneur en eau (%)
pulpe brute non broyée	6
pulpe micronisée 160 μ m	0,95
pulpe micronisée 80 μ m	1,68
pulpe micronisée 40 μ m	3,45

Tableau 30: Teneurs en eau des différents lots de pulpes

Il est certain qu'avec des teneurs en eau aussi faibles, les lipides présents dans les échantillons sont particulièrement exposés à l'oxydation.

III.8.2. Masse spécifique des pulpes micronisées

Tout broyage modifie la masse spécifique du produit concerné. Il était donc intéressant de déterminer cette variation dans le cas d'un broyage très fin. Afin d'éliminer avec certitude l'air résiduel, cette détermination est effectuée par immersion dans du pétrole qui présente l'avantage de bien "mouiller" les fines particules de pulpe, l'air étant éliminé par dépression.

Les résultats obtenus montrent cependant que la masse spécifique est pratiquement la même .

Echantillon	Masse spécifique du produit sec (g/ml)
160 μm	1,49
80 μm	1,50
40 μm	1,51

Tableau 31: Détermination de la masse spécifique des lots micronisés

III.8.3. Pouvoir gonflant.

Nous avons repris ici la méthode employée lors des essais précédents pour déterminer avec précision la quantité d'eau retenue par gramme de pulpes sèches. De plus nous avons été amenés à étudier le comportement de la pulpe dans différents milieux aqueux (eau distillée, solutions de saccharose à 10% et à 20% (p/v) dans l'eau distillée et solution de NaCl à 9g/l d'eau distillée). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 32:

Ces résultats conduisent à quelques commentaires:

- tout d'abord la comparaison avec les résultats fournis précédemment, montrent que le pouvoir gonflant dans l'eau de la pulpe brute très grossièrement broyée (particules de quelques millimètres de diamètre) était de 5,35ml/g. Ceci montre que la micronisation augmente très

nettement (55%) le pouvoir gonflant ce qui s'explique par une plus grande accessibilité de l'eau vers les structures capables de la retenir.

- l'utilisation d'une solution de saccharose à 10%(p/v) ne modifie pas le pouvoir gonflant, en revanche le saccharose à 20%(p/v) entraîne dans tous les cas une diminution d'environ 15% de la rétention d'eau.

- fait très intéressant, c'est avec la solution de NaCl à 9g/l (eau physiologique) que l'on observe la plus grande diminution du pouvoir gonflant (-17% pour la granulométrie 160 μ m à -11% pour 40 μ m).

Echantillon	Eau distillée	Saccharose 10%(p/v)	Saccharose 20%(p/v)	NaCl 9g/l
160 μ m	8,3	8,3	7,1	6,9
80 μ m	8,2	8,15	7,1	7,1
40 μ m	8,2	8,1	7,2	7,3

Tableau 32: Pouvoir gonflant des différents lots de pulpes micronisées exprimé par la différence entre le volume (ml) de gonflement en milieu aqueux et le volume (ml) de gonflement dans du pétrole de 1 g de matière sèche

III.8.4. Déterminations de la teneur en fibres alimentaires

Ces déterminations ont été effectuées suivant la méthode d'analyse préconisée par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Les résultats obtenus sont les suivants:

Echantillon	% Protéines=N Kjeldhal x 6,25	% Cendres	Fibres alimentaires totales(g%g de produit sec)
160 μ m	4,9	7,5	73,2
80 μ m	4,7	7,5	73,3
40 μ m	4,8	7,2	73,8

Tableau 33: Teneurs en fibres alimentaires des lots micronisés

Le pourcentage de fibres alimentaires est donc très élevé. On remarque d'autre part que la micronisation n'influence pour ainsi dire pas les résultats car, étant donné le grand nombre d'opérations successives nécessaires pour arriver à ce résultat, le chiffre après la virgule n'est qu'indicatif. Il faut noter une teneur en cendres un plus importante que dans le cas de la pulpe brute. Ce résultat est difficilement explicable cependant, il est possible que cette quantité en cendres provienne du broyage proprement dit. Ainsi donc comme nous le pensions la teneur en fibres alimentaires totales est élevée et ce résultat est encore amélioré par le

blanchissement et par la suite par la délipidation. Remarquons par ailleurs que nous retrouvons très exactement le résultat obtenu précédemment pour la teneur en fractions insolubles de la pulpe brute (nous avons trouvé 73,2% de fibres alimentaires)

La comparaison des différentes méthodes utilisées montre que dans tous les cas les pulpes de betterave ont une teneur très élevée en fibres alimentaires; rappelons en outre que le traitement de blanchissement entraîne une augmentation relative de la teneur en fibres.

III.8.5. Conclusion

En conclusion on peut dire que la micronisation des pulpes permet une augmentation très nette de son pouvoir gonflant. Il n'est cependant pas apparu de différences sensibles entre les trois lots; on peut encore ajouter que plus la granulométrie est fine et plus on est confronté aux risques d'oxydation des lipides si ceux-ci ne sont pas préalablement éliminés d'où la nécessité d'une délipidation.

III.9. Délipidation des pulpes de betteraves

III.9.1. Extraction des lipides

Les pulpes de betteraves séchées, après extraction du saccharose, acquièrent très rapidement lors de leur broyage une odeur de

rance très désagréable due à l'oxydation des lipides. Cette odeur, qui est absente des lots de pulpes non broyées, se développe d'autant plus rapidement et intensément que le broyage est plus poussé et que le produit est plus sec, ce qui est conforme à ce que l'on peut attendre d'un tel produit.

De plus, tout chauffage, après l'introduction dans un produit alimentaire nécessitant cuisson, accélère très nettement l'apparition du rancissement ce qui à terme rend difficile l'utilisation de ces pulpes. Ce travail a pour but de proposer un procédé applicable industriellement et permettant d'éviter l'oxydation des lipides.

L'élimination des lipides d'un produit quelconque peut se réaliser de différentes manières. Cependant, dans notre cas, il est nécessaire d'une part de modifier le moins possible la pulpe de départ, (si ce n'est dans le sens d'une amélioration des qualités fonctionnelles), et d'autre part de ne pas rajouter de produits chimiques que l'on ne serait pas certain d'éliminer totalement. Ainsi nous avons été amenés à expérimenter des solvants réputés moins efficaces que les solvants de délipidation classiques (éther de pétrole, hexane, chloroforme,...) mais qui ne présentent pas de risque de toxicité. Nous avons essayé différents alcools (éthanol, propanol,...) et enfin des mélanges éthanol-eau en proportions variables.

Dans tous les cas, afin de respecter au mieux les préoccupations industrielles, le traitement à l'éthanol a été appliqué à des pulpes non broyées. Le broyage doit permettre une meilleure extraction des lipides, cependant il rend indispensable leur séchage. Cela conduit nécessairement après extraction des lipides à un second séchage et donc à une dépense d'énergie. On ne peut cependant pas écarter, au cours de l'extraction, la possibilité d'un malaxage suffisamment puissant qui tendrait à réduire la taille des particules pour en extraire plus facilement les constituants solubles.

Ce travail a été toujours porté sur des pulpes brutes séchées ne présentant pas d'odeur particulière de rancissement lors de la mise en extraction.

Après un certain nombre d'essais, nous avons retenu l'extraction à chaud par l'éthanol. Nous avons fait varier les proportions respectives d'éthanol et d'eau afin de comparer les résultats obtenus.

La détermination des fibres alimentaires a été réalisée comme lors de l'étude précédente par la méthode AOAC, les résultats sont donc directement comparables. Les résultats globaux sont reportés dans le tableau 34:

Echantillon	Perte en poids lors de l'extraction	Sucres totaux extraits	Lipides extraits	Fibres alimentaires
Pulpe brute	/	/	0,9 %	74,9 %
Extraction éthanol 66% puis 96%	12,0 %	9,0 %	0,6 %	84,2 %
Extraction éthanol 66%	11,3 %	8,1 %	0,3 %	83,9 %
Extraction éthanol 96%	4,9 %	4,6 %	0,45 %	80,5 %
Extraction éthanol 80%	9,9 %	8,2 %	0,46 %	83,5 %

(en g pour 100g de pulpe sèche)

Tableau 34: Analyse des pulpes après différentes extractions

La teneur initiale en lipides est faible et il est difficile de tirer des conclusions sur l'efficacité des traitements par le seul dosage pondéral des lipides. Cependant, on remarque que l'extraction la meilleure est celle qui se fait en deux temps, éthanol à 66% puis éthanol à 96%, cependant l'éthanol à 80% extrait aussi bien les lipides que l'éthanol à 96% tandis que l'éthanol à 66% semble être solvant le moins bon.

Le dosage par chromatographie en phase gazeuse a montré qu'il y avait très peu de différences dans la composition en acides gras des lipides extraits. Cette composition se traduit par la présence de 55% d'acides gras saturés (traces de C₁₂ et de C₁₄ 45 à 50% de C_{16:0} et traces de C_{18:0}) et 45% d'acides gras insaturés (15% de C_{18:1}, 25 à 30% de C_{18:2} et 3 à 6% de C_{18:3}).

Si on considère la perte de poids, on observe là encore que c'est l'extraction en deux temps éthanol à 66% puis éthanol à 96% qui entraîne la plus forte perte en matière sèche (12%) suivie dans l'ordre par l'éthanol à 66% (11,3%), par l'éthanol à 80% (9,9%) et par l'éthanol à 96% (seulement 4,9%)

Cette perte de poids semble affecter de préférence des produits hydrophiles; comme cette perte est loin d'être négligeable nous avons procédé à la détermination de la nature des produits extraits. Les résultats du dosage des sucres totaux montrent bien que la majeure partie de la perte de poids (75 à 93%) correspond à une perte en glucides. Ce résultat nous a amené à nous interroger sur le devenir des fibres alimentaires des pulpes extraites; il s'agissait en fait de savoir si ces sucres provenaient de la fraction soluble ou de la fraction insoluble.

La détermination de la teneur en fibres par la méthode AOAC montre que cette teneur augmente de façon importante puisqu'elle passe de 75% à 84,2% pour l'extraction en deux temps (éthanol à 66% puis éthanol à 96%). En revanche elle atteint déjà 84% pour l'éthanol à 66% et 83,5% pour l'éthanol à 80% mais seulement 80,5% pour l'éthanol à 96%. Ces résultats sont donc très

encourageants car, non seulement nous avons éliminé la majeure partie des lipides et des glucides solubles, mais il semble aussi que les fibres n'ont pas été touchées par le traitement.

Il restait un problème important à régler: l'extraction des lipides est-elle suffisante pour éviter tout risque de rancissement du produit obtenu?

Dans un premier temps nous nous sommes contentés du test olfactif décrit plus haut. On observe dans tous les cas un développement rapide (moins de 48 heures) du rancissement sur les lots de pulpes non extraites, avec apparition d'une odeur très désagréable. En revanche les tests olfactifs n'ont pas révélé d'odeur désagréable pour les lots traités à l'éthanol. Ce test simple n'est cependant pas suffisant et nous avons tenté de quantifier l'état de rancissement en déterminant la teneur en malonaldéhyde présent dans les différents lots de pulpes. Les acides gras insaturés, qui représentent 50% des acides gras totaux, sont oxydés en présence de l'oxygène de l'air en différents produits carbonylés et en particulier en aldéhyde, dont le malonaldéhyde. Ce dernier a la propriété de donner, dans certaines conditions de milieu et de température, un complexe rouge avec l'acide thiobarbiturique, complexe que l'on détermine par spectrophotométrie.

Nous nous sommes contentés d'une détermination relative de la teneur en malonaldéhyde en affectant la valeur 100 à la teneur en malonaldéhyde de la pulpe micronisée (40 μ m) après 7 mois de conservation à température ambiante dans sa boîte métallique d'origine (ce lot présente une très forte odeur de rance) Le tableau 35 rapporte les résultats obtenus.

Ce dosage très sensible, permet de dire que l'extraction double, éthanol à 66% puis éthanol à 96%, est la meilleure de toutes celles que nous avons effectuées. Le chauffage à sec pendant 16 heures de ce lot ne développe plus de malonaldéhyde. Cependant la méthode est longue, elle peut

Lots testés	Teneur en malonaldéhyde
A: pulpe brute micronisée(40µm)	100
B: pulpe brute 8 jours après broyage	54
C: pulpe brute 3 mois après broyage	59
B': B chauffée à 45°C (16h)	58
D: pulpe extraite à l'éthanol à 60% puis à l'éthanol à 96% et conservée 3 mois après broyage	9
D': D chauffée à 45°C (16h)	9
E: pulpe extraite à l'éthanol à 66% et conservée 3 mois après broyage	22
E': E chauffée 45°C (16h)	26
F: pulpe extraite à l'éthanol à 96% et conservée 3 mois après broyage	24
F': F chauffée à 45°C (16h)	35
G: pulpe extraite à l'éthanol à 80% et conservée 3 mois après broyage	13
G': G chauffée à 45°C (16h)	13

Tableau 35: Teneurs comparatives en malonaldéhyde des différents lots analysés

avantageusement être remplacée par une extraction à l'éthanol à 80%, pour laquelle la teneur en malonaldéhyde reste très faible et ne varie pas, non plus après chauffage. En revanche les extractions à l'éthanol à 66% ou à l'éthanol 96% ne sont pas suffisantes (teneur en malonaldéhyde 2 fois plus élevée que celle de la pulpe extraite à l'éthanol à 80% et qui s'accroît encore après chauffage).

Comme prévu, la pulpe brute, 8 jours après broyage, présente déjà une teneur en malonaldéhyde de 54 et qui s'accroît encore (58) après chauffage pendant 16 heures à 45°C. La même pulpe présente une teneur en malonaldéhyde de 59 après 3 mois de conservation à l'état broyé.

III.9.2. Conclusion

Cette étude montre l'impérieuse nécessité de l'extraction des lipides afin d'éviter les processus oxydatifs de rancissement. Nous avons retenu l'extraction à l'éthanol à 80% (v/v) dans l'eau pendant 6 heures à reflux comme étant le meilleur compromis d'extraction, permettant d'obtenir une pulpe à teneur importante en fibres alimentaires (83,5%) ce qui représente un gain de 10 points par rapport à la pulpe brute. En même temps ce traitement permet de garantir une pulpe qui ne présente plus de mauvaises odeurs même après trois mois de conservation à température ambiante. Il serait opportun-toutefois de compléter ce travail par une étude qui porterait sur les pulpes non séchées à la sortie du diffuseur afin d'optimiser les conditions de traitement les meilleures en vue d'une optimisation de leurs propriétés fonctionnelles.

CONCLUSION

Notre recherche a porté tout d'abord sur les causes possibles de la baisse d'efficacité, dans le temps, des résines échangeuses d'ions dans le cadre de la "Nouvelle déminéralisation" ("ND"). Cette déminution d'efficacité pouvait découler directement de leur "encrassement" progressif lié à la fixation de constituants macromoléculaires devenant rapidement insolubles.

Il a pu être confirmé que les saponines ne sont pas essentiellement responsables de la turbidité des sirops et des EP2 et qu'elles sont fixées par les résines de ND dont elles peuvent être détachées par traitement avec une saumure de NaCl.

La recherche des polyphénols dans les résidus de dialyse montre qu'ils sont peu abondants (<1%), cependant que la teneur en protéines (et assimilés) bien que plus élevée dans les EP2 danois 25% contre 20% pour l'EP2 français ne semble pas avoir d'incidence déterminante sur leur aptitude à la floculation.

La composition en sucre simples (Arabinose, rhamnose, galactose, glucose, mannose, fucose et fructose) après hydrolyse des adialysats des EP2 danois et d'Eppeville ne présentent pas de différences significatives. Il est intéressant de noter par ailleurs que la composition de la partie floculée de l'EP2 d'Eppeville est riche en glucose (66%) ce qui permet d'avancer l'idée que cette fraction incorpore une teneur non négligeable en glucanes.

Ces observations nous ont permis ensuite de procéder à des comparaisons des compositions en polysides des échantillons d'Eppeville et danois, par fractionnement sur résine échangeuse d'ions Sepharose CL 6B. Les résultats obtenus montrent que les EP2 danois sont significativement plus riches en molécules non chargées que les EP2 d'Eppeville. Cette comparaison a été poursuivie par une chromatographie sur résine échangeuse d'ions DEAE Sepharose CL 6B avant et après un passage sur IRA 35S:

a- avant passage préalable sur IRA 35S:

Le fractionnement a porté sur des produits préalablement séparés par ultrafiltration pour pouvoir recueillir les fractions $PM > 10000$ et $2000 < PM < 10000$. La détermination sur chaque fraction de la teneur en sucres totaux et du pouvoir réducteur a permis de montrer comparativement que l'EP2 danois contient davantage de polysides non chargés que les EP2

d'Eppeville, ce qui implique une teneur relative en polyosides chargés plus élevée pour Eppeville.

Dans le cas de la fraction $2000 < PM < 10000$ les différences de composition entre les deux échantillons sont beaucoup moins marquées que pour la fraction supérieure à 10000.

b- après passage sur IRA 35S + IRC 84(ND):

Le passage des EP sur résine de ND a été accompagné de fractionnement sur résine anionique DEAE Sepharose CL 6B.

Les résultats montrent que les résines de ND retiennent efficacement les produits chargés, normalement retenus sur colonne de DEAE Sepharose CL 6B, cependant les produits non chargés ne sont pas éliminés des EP. A noter que cependant que le comportement de l'EP2 danois par passage direct sur DEAE Sepharose conduit à un profil de fractionnement tout à fait comparable à celui obtenu pour Eppeville, après traitement préalable avec les résines de ND.

Pour affiner et compléter les résultats de fractionnements chromatographiques sur résines échangeuses d'ions, il était indispensable de définir la taille moléculaire des différentes fractions en opérant un fractionnement par "filtration sur gel". Ainsi le fractionnement des différents échantillons sur Trisacryl GF O5 donne lieu à deux fractions F1 (grosses molécules) et F2 (petites molécules). Cette dernière renferme aussi du saccharose et des sels minéraux.

Les résultats obtenus à la suite de ce fractionnement montrent que le comportement des EP2 de Nakskov, Eppeville et Saskopig est voisin et se différencie nettement de celui d'Appeldorn. on peut en dire autant des sirops à la différence près que la fraction F1 qui incorpore les molécules les plus volumineuses est significativement marquée par l'élimination de la plus

grande partie des constituants rassemblés dans le premier pic. On peut aussi noter une autre observation intéressante concernant les sucres roux de Nakskov et Saskopig, qui sont significativement beaucoup plus pauvres en grosses molécules que celui d'Eppeville.

Pour comparer les teneurs respectives et les rapports entre grosses molécules chargées et non chargées des EP2, des sirops et des sucres roux, les fractions F1 correspondantes ont été fractionnées à leur tour sur échangeur anionique DEAE Sepharose CL 6B. Dans tous les cas on note un accroissement du rapport chargés/non chargés (C/NC) quand on passe du sirop à l'EP2 puis au sucre roux en remarquant que la teneur en molécules chargées est plus grande pour Eppeville que pour Nakskov.

De même l'étude de la composition en grosses molécules des trois phases provenant de la déstabilisation d'un EP2 d'Eppeville montre que ces dernières sont en concentration plus élevée dans la phase surnagente.

La compétition des différents constituants hydrophiles (saccharose, substances polyosidiques) pour l'eau a été étudiée par déplacement de l'équilibre par addition d'alcool au milieu sucré en vue de provoquer une cristallisation (ou floculation) fractionnée que l'on peut suivre par néphélométrie.

La comparaison des EP2 d'Eppeville et d'Assens à 20 Brix de matière sèche pour deux pH différents 6,5 et 3,5 fait ressortir une meilleure aptitude à la cristallisation de l'EP2 d'Assens par rapport à celui d'Eppeville. Cette aptitude semble pouvoir être corrélée avec le caractère plus hydrophile du système à pH 3,5.

La fraction F1 de l'EP2 de Nakskov entraîne un déplacement hydrophile de la courbe de cristallisation, le comportement reste similaire à celui du sucre raffiné. Pour l'EP2 d'Eppeville on observe une perturbation significative du processus de cristallisation en même temps qu'un déplacement hydrophile de la courbe de turbidité.

Les constituants de la fraction F2 (petites molécules) entraînent un déplacement hydrophile plus marqué dans le cas de la fraction F2 d'Eppeville que pour celle de Nakskov. Tant que la concentration en substances F2 n'est pas très élevée il y a modification de l'hydrophilie du système sans gêne apparente pour la cristallisation. Lorsque cette concentration est plus élevée il y a à la fois modification de l'hydrophilie et de la courbe de cristallisation pour Eppeville tandis que pour la fraction F2 de Nakskov l'effet hydrophile est plus limité, sans modification de la forme de la courbe de cristallisation.

La fixation des pigments par passage sur Sep pack C18 en vue de leur récupération par élution en milieu hydroalcoolique nous a permis de montrer que ces substances formées d'un mélange de molécules chargées et non chargées sont pratiquement sans influence sur les courbes enregistrées par néphélométrie.

L'ensemble de ces observations concourt à faire admettre que le caractère plus chargé des grosses molécules des EP d'Eppeville est lié soit au passage en solution d'une partie de grosses molécules issue d'une purification calco-carbonique incomplète, soit au traitement thermique (température, durée, pH) qui favorise la formation de substances chargées et modifie les propriétés hydrophiles.

L'hydrolyse alcaline des pulpes de betterave montre que la dégradation des pulpes est d'autant plus importante que le pH est plus élevé. Il semble que les pectines faisant partie des fractions les plus touchées. On remarque que l'entraînement d'une partie des constituants solubles des pulpes au travers du processus d'épuration va entraîner notamment la dégradation des pectines. Il est probable en même temps que les hémicelluloses dont certains sont solubles en milieu basique doivent résister au pH basique et ont toutes les chances de se retrouver en partie dans les jus sucrés.

IL s'est avéré d'après cette étude que le peroxyde d'hydrogène est tout à fait efficace pour la décoloration des pulpes. cette décoloration est directement fonction de la concentration en peroxyde, de la température et de la durée de la réaction.

La micronisation des pulpes permet une augmentation très nette du pouvoir gonflant. Cependant, plus la granulométrie est fine et plus on est confronté aux risques d'oxydation des lipides.

Cette étude montre l'impérieuse nécessité de l'extraction des lipides afin d'éviter les processus oxydatifs de rancissement. La meilleure extraction à laquelle nous sommes parvenu est celle à l'éthanol à 80% (v/v) dans l'eau pendant 6 heures à reflux. Cette extraction permet d'obtenir une pulpe à teneur optimale en fibres alimentaires (83,5%), ce qui représente un gain de 10 points par rapport à la pulpe brute. En même temps il est important d'observer qu'elle ne présente pas de mauvaises odeurs imputables au rancissement des lipides même après trois mois de conservation à température ambiante.

BIBLIOGRAPHIE

AITAMAR, H. 1980. Essais sur les problèmes du développement agricole.
Institut National Agronomique Algerie

ALLEN, A. T., WOOD, D. M. et MCDONALD, M. P. 1974. Sugar Technol.
Rev. 2; 165-180

ASENJO, J., CONTRERAS, I., GONZALEZ, M. et RONCO, A. 1982.
Biotechnol. lett. 4; 51-56.

ASP, N. G. 1987. Molec. Aspects Med 9; 17-29

BAJON, A.M., YUEN, T. L., FONG, L. S. et OLAK, G. M. 1985. Biotechnol.
Lett. 7; 203-306.

BAKER, J. O. et HIMEL, M. E. 1986. J. Chromatogr. 161-181

BAXA, J. et BRUHNS, G. 1967. "Zucker ion leben der vëlker" Verlag Dr
Albert Barteus. 153-154

BELDMAN, G. ROMBOUITS, F. M., VORAGEN, A. G. J. et PILNIK, W.
1984. Enz. Microb. Technol. 16; 503-507.

BELTON, P. S. et WRIGHT, K. M. 1986. J. Chem. Soc. Faraday Trans 82; 45-
456

BENTO, L. S. M. 1990. Int. Sugar Jnl. 92; 116-125

BERTIN, C., ROUAU, C. et THIBAUT, J. F. 1988. J. Sci. Food Agric. 44; 15-29.

BLUMENKRANTZ, ASBOE-HANSEN, G. 1973. Anal. Biochem. 54; 484-489.

BROSIO, E. CONTI, F. LINTAS, C. et SYKORA, S. 1978. J. Food Technol. 13; 107-116

BROSIO, E., CONTI, F., LINTAS, C. et SYKORA, S. 1983. J. Food Technol. 18; 219-226

BROUGHTON, N. W. 1986. Proc., Sugar. Proc. Res. 174-209

BURKITT, D. P., WALKER, A. R. P. et PAINTER, N. S. 1974. J. Amer. Assn. 229; 1068-1073.

CARRUTHERS, A. , DUTTON, J. V. et OLDFIELD, J. F. T. 1963. I.S.J. 65; 297-330

CARRUTHERS, A., OLDFIED, J. F. T. et TEAGUE, H. E. 1965. 18 th Ann. Tech. Brit. Sugar.

COPICOVA, J., NOVOTNY, D., KVASNICKA, A. et KADLEK, D. 1989. Listy Cukrovanicke. 105; 44-48.

COULTATE, T. P. 1988. Food. The Chemistry of its components Second editions. Royal society of chemistry.

CUMMINGS, J. 1981. Br. Med. Bull. 37; 65-70

DEA, I. C. M. et MADDEN, J. K. 1986. Food Hydrocolloides. 1; 71-88.

DERUY, G. DUCATILLON, J. P. et LESCURE, J. P. 1989. Sucrierie Française 130; 96-100.

DEVILLERS, P. 1981. Cultivar- Special Betterave- La sucrierie. 144; 142-145.

DEVILLERS, P., LOITIER, M. et CHARTIER, J. C. 1968. Sucrierie Française 1; 193-

DUBOIS, M. et GILLET, K. A. 1956. Anal. Chem. 28; 350-356

DUBOURS, J. 1952. "Sucrierie de betteraves" Nouvelles encyclopedie agricole

EHRlich, F. et REHORST, K. 1925. Ber 58B 1919-1922

EIS, F. G., CLARK, R. A. et MCGENNIS, R. A. 1952. Int. Eng. Chem. 44; 2844-2888

FRANKS, F., REID, D. S. et SUGGETT, A. 1973. Journ. Sol. Chem. 2; 99-117

GAERTNER, H. Z. 1919. Ver dent. Zuckend. 69; 233

GOODBRAN, A. E. et STARK, J. B. 1962. J. Am. Soc. Sugar Beet Technol. 12; 238-244

GOODENOUGH, P. W., TUCKER, G. A., GRIESON, D. et THOMAS, T. 1982.
Phytochem. 21; 281.

GORZANOWSKY, P. et BARTHOLOMAE, F. 1961. Zecker 14; 378-382

GUILLON, F. , THIBAUT, J. F. ROMBOUTS, F. M. et PILNIK, W. 1986.
Cell Wall's 86.

GUILLON, F. et THIBAUT, J. F. 1987. Food Hydrocolloids. 1(5-6); 547-549)

GUILLOU-CHARPIN, M. LEBOTLAN, D., TALLIER, C. et MECHIN, B.
1990. Sciences des aliments 10; 377-386

HAAR, A. W. 1927. Vander Rev. Trav. Chem. 46; 775-792

HALUK, J. P., BADI, F. et METCHE, M. 1986. C.R. de groupe de
polyphenols, Montpellier 13; 309-314

HARTEL, R. N. 1987. Manufacturing Confectionner 67; (10); 59-65

HARTEL, P. W. et SHASTRY, A. V. 1991. Critical Rev. in Food Sci. and Nut.
1; 49-112.

HASHIBA, H. 1982. Agric. Biol. Chem. 47; 547-548

HERVE, D. 1974. Process. Biochemistry 9; 31-34

HERVE, D. 1987. I.A.A. 104; 665-699

HODGE, J. E. 1953. J. Agric. Food Chem. 1; 928-948

ILANES, A. et SCHAFFELD, G. 1982. Rev. Argent. Microbiol. 14; 97-104

JANADO, M. et NISHADA, T. J. 1981. Solution Chem. 10; 489.

KAWAMOTO, T. et OKADA, E. 1983. J. Chromatogr. 258-284.

KELLY, P. 1983. Anim. Feed. Sci. Technol. 8; 1-18

KELSAY, J. L. 1978 Am. J. Clin. Nutr. 31; 142-159.

KERAMAT, J. et NURSTEN, H. E. 1990. Departement Food Science and Technology, University of Reading RG6, 2AP. U.K. 239-242

KIEBOOM, A. P. G. et VANBEKKUM, H. 1985. "In starch conversion, technology" Marcel Dekker, New York 263

KNAPPERT, D., GRETHLEIN, M. et CONVERSE A. 1980. Biotechnol. Bioengineering 22; 1449-1463.

KOFODNIELSEN, W., MADSEN, R. F. et WINSTROM, O. 1980. Sucrierie Belge 99; 3-20

KRYLOV, E. J. et KHARI, N. 1971. Iz Vuz Pish. Technol. 2; 158-161.

LABAT, T., GARCIA, J. MEYER, F. et DESCHANPS, J. 1984. Biotechnol. Lett. 6; 379-384.

- LANG, K. W. et STEINBERG, M. P. 1981. J. Food Sci. 46; 1450-1452
- LEBOLTAN, D., GUILLOU- CHARPIN, M. et TELLIER, C. 1988. Sci. Aliments 81; 565-573
- LEBOTLAN, D. et NICOLAIDIS, M. 1989. Sciences des aliments 3; 543-551
- LIANG, B., HARTEL, R. W. et BERGLUND, K. A. 1988. Int. Sugar Jnl. 90; 25-28
- LIANG, B. M., HARTEL, R. W. et BERGLUND, K. A. 1987. Chemical Engineering Scienc. 42; 2723-2727
- LI SUI FONG, J. C. et MBAGA, G.I. 1982. Interant. Sugar J. 84; 105- 108.
- MADSEN, N. W., WINSTOM-OLSEN, B. et NIELSEN, T. E. 1978. Sugar Technol. Rev. 6; 1140
- MADSEN, R. F. 1986. Zuckeind. 111; 1121-1126.
- MAHFOUD, Z. et BELCADI, A. 1990. Cahier Scientifique et Techniques I.A.A. 107; 1227-1234
- MAILLARD, L. C. 1916. Ann. Chem. 5; 258-317
- MANTOVANI, G. 1985. Ind; Sacc. Ital. 78; 7-14
- MANTOVANI, G. 1986. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 19; 663-669

Manuel de sucrerie. 1979. Edité par Societé sucrière d'étude et de consièls. 3ème édition. Belgique.

MARGARET, A., CLARKE, M. A., GOODSHALL, R. B. et GARRY, T. P. 1989. Zuckerind. 114; 709-713

MARRY, T. J., KIMBER, L. et CHANG, C. 1972. Phytochemistry 1; 145-160

MATHLOUTHI, M. 1981. Carbohydrate Resheach 91; 113-123

MATHLOUTHI, M., CHOLLI, A. et KOENIG, J. L. 1986. Carbohydrate Resheach 147; 1-9

MAUCH, W. 1971. Sug. Tech. Rev. 1, 239

MAURANDI, V. 1988. Ind. Sacc. Ital. 81; 47-52

MC CAIN, D. C. et MARKLEY, J. L. 1986. Carbohydrate Research 152; 73-80

MC CREADY, R. M. 1966. Review of their chemistry. J. Amer. Soc Sugar Beet Technol. 14; 261

MC GINNIS, R. A. 1982. "Beet sugar technologi, Beet sugar developement fondation, Fort Collins

MC GINNIS, R. A. et MULLER, E. G. 1984. Sugar Technolgy Reviews 12; 53

Mc CREADY, R .M. et GEE, M. 1960. J. Agr. Food. Chem. 8; 510-513.

Mc CREADY, R. M. 1966. J. Am. of Sugar Beet Technol. 14(3); 266.

MENIER, A. 1989. Thèse de l'Université Paris VI.

MICHEL, F., THIBAUT, J. F. et BARRY, J. L. 1988. J. Sci. Food Agric. 42;
77-85

MOLONEY, A. P., O'RORKE, A. CONSIDINE, P. . et COUGHLAN, M.
P.1984. Biotechnology and Bioengineering. 26; 714-718.

NEVILLE, A. J. 1912. J.Am. Chem. 101; 1101

NICOL, W. M. et FARMER, C. L. 1972. La sucrerie Belge. 91; (2). 55.

NOMURA, N. S., BROBST, K. M. et HILTON, H. 1984. Int. Sugar. J. 86; 244-
250.

PAYNE, M. G., HEKER, R. J. et MAAG, G. W. 1970. 16th Gen. Mtg. Amer.
Soc. of Sugar Beet Technol. Denver.

PHATAK, L., CHANG, K. C. et BROWN, G. 1988. Journal of Food Science
53; 830-833

POEL, P. W., VERHAART, M. L. A. et VISSER, N. H. M. 1964. I.S.J. LXVI,
317-319.

PONANT, J. 1985. Journée d'étude "L'éthanol de fermentation" ACIA Paris.

PONANT, J. FOISSAC, S. et ESNAULT, A. 1988. Zuckerind. 113; 665-675.

RAMM, S. 1988. Proc. Sugar Industry Tech. 161-179

REINEFELD, E. BLIESENER, K. M., BRANDES, E. et BORRASS, V. 1982.
La Sucrierie Belge 101; 333-345

REINEFELD, E., BLIESENER, K. M., PALM, M. et MULLER, J. 1971.
Zucker. 24; 420.

REY, D. K. et LABUDZA, T. P. 1981. J. Food Sci. 46; 786

REYNOLDS, T. H. 1965. Adv. Food Res. 14; 167-283

RICHARDSON, S. J., BAIANU, I. C. et STEINBERG, M. P. 1987. Journ. of
Food Science 52; 806-809

ROBERTS, E. J., CLARKE, M. A., GODSHALL, M. A. et CARPENTER, F. G.
1978. The Sugar journal 40; 21-23

ROBERTS, E. J., GODSHALL, M. A., CARPENTER, F. G. et CLARKE, M. A.
1976. Int. Sugar J. 78; 163-165

ROCHE, M. Les industries Agricoles et Alimentaires, Progrès des Sciences et
Techniques

ROMBOUTS, F. M. et THIBAUT, J. F. 1986. Carbohydrate Research. 154;
177-187.

ROMBOULTS, F., THIBOULT, F. 1986. Chemistry and Function of Pectins. chap. 5; 49-60 ACS n° 31.

ROUSSEAU, G. 1985. Cahier scientifique et technique I.A.A. 102; 665-670.

ROUSSEAU, G. et LANCRENON, X. 1984. Sugar y azucar 79; 25-31

ROUSSEAU, G., ROVEL, B. et METCHE, M. 1990. Cahier Scientifique et techniques I.A.A. 107; 629-636

SASKA, M. 1988. Sugar J. 50; 4-6

SASKA, M. et OUBRAHIM, Y. 1989. Int. Sugar Jnl. 91; 109-116

SCHAFFELD, D. et ILLANES, A. 1987. J. Chem. Techn. Biotechnol. 39; 161-171.

SCHAFFELD, G. et ILLANES, A. 1982. Biotechnol. Lett. 4; 667-672.

SCHIWECK, H. et BÜSCHING, L. 1974. Zucker. 27; 122.

SCHLIEPHAKE, D., AUSTMEYER, K. E. et HEMPELMANN, R. 1987. Zuckerindustrie. 112; 269-274.

SHANKS, B. H. et BERGLUD, K. A. 1985. AICh. E. J. 31; 152-154

SHIN; S. C. 1985. Jour. of Food Science 50; 823-825

SHORE, M, 1984. Sugar Technol. Rev. 1; 99

SHORE, M., BROUGHTON, N. W., DUTTON, J.V. et SISSONS, A. 1984.
27ème Conférence de la British Sugar.

SHRIJADHAV, R. D., PIMPALKARG, G. et JOSHI, G. V. 1988.
Indiansugar 38; 441-443

SIDI ALI, L., COCHET, N., GHOSE, T. F. et LEBEAULT, J. F. 1984.
Biotechnology Letters. 6(11) 723-728.

SMITHE, B. M. 1967. Aut. J. Chem. 20; 1087- 1097 et 1115.

SPECK, J. C. 1958. Adv. Carbohydr. Chem. 13; 63

SREENATH, M. K. et NAN JUNDAS WAMY A. M. 1987. J. of Food Science.
52; 230-231.

THIBAUT, J. F. et ROMBOUTS, F. M. 1986. Carbohydrate Research. 154;
189-203.

TROWELL, H. C. 1976. Am. J. Clin. Nutr. 29; 417-427

TROWELL, M. C. 1974. Lancet 1; 503

TULLIN, V. 1950. VIII Th Congr. Int. Ind. Agric. Bruxelles

VACCARI, G., GODSHALL, M. A. et NEMETH, M. 1990. Zuckerindustrie
115; 383-386

- VACCARI, G. SGUALDINO, G. et VIGNALI, A. 1987. I.A.A. 104; 1177-1180
- VAN D., SCHRIENER, W. H. et PILNIK, W. 1987. Acta Alimentaria. 16(2); 143-153.
- VANDER-POEL, P. W., STRUIJS, J. L. M., VRIENDS, J. P. M. et MARIJNISSEN, A. A. W. 1987. Int. Sugar. Jnl. 89; 72-78
- VANHOOK, A. 1987. Zuckerindustrie 112; 397-600
- VOGEL, M. et SCHIWECK, H. 1988. Zuckeind. 113; 773-775.
- WEN, L. F., CHANG, K. C., BROWN, G. et GALLAHER, D. D. 1988. Journal of Food Science 53; 836-829
- WHISTLER, R. I. et SMART, C. L. 1953. Polysaccharide Chemistry; chap. 7; Academic Press New-York 161-197.
- WINSTROM-OLSEN, B. 1979. Int. Sugar J. 81; 332-336
- ZABIK, M. E. et SHAFFER, M. 1977. J. Food Sci. 42; 1428-1431.
- ZIELKE, R. 1970. "Yield and selected chemical constituents of the sugar beet root groun" Ph. D. Thesis Michigan state University; East Lunsing Michis.
- ZNEDEK, B. et PAVEL, K. 1988. Listy Cukrovarnicke. 104; 174-182.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o0o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDŒUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur MATHLOUTHI M., Professeur, Université de Reims,
Monsieur BONALY R., Professeur, Faculté de Pharmacie Nancy.**



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur BELGHITI Abderrahim

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Nature des polysaccharides issus du process d'extraction du
saccharose à partir de la betterave"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, **13 Octobre 1993**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIEN

