
RAPPORT DE STAGE

Développement et validation d’une méthode analytique par analyseur
de flux automatisé.
Cas spécifique du dosage des pectines

JURY : Mme Virginie VIVES et M. Pascal SEYER

Clarisse MIOSSEC
Stage de fin d’études DUT génie biologique -option ABB
Université de MONTPELLIER
Année universitaire 2020-2021
Tuteur : M. Julien RICCI

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 3 qui m'ont aidée lorsque cela était nécessaire, et pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu. Je remercie spécifiquement :

Julien RICCI, mon maître de stage, pour la confiance qu'il m'a accordée sur ce projet, pour m'avoir guidée tout au long de ce stage, et donné de précieux conseils le tout avec pédagogie et bonne humeur.

Léa OLLIER, technicienne de laboratoire, pour avoir pris le temps de répondre à toutes mes interrogations et pour son aide lors des différentes manipulations.

Christian MESTRES, chercheur en physico-chimie des amyloses, pour le cadre qu'il a su donner à mes expérimentations.

Enfin, je remercie tout le personnel administratif qui a fait en sorte que mon stage se passe dans les meilleures conditions possibles.

Liste des abréviations

CIRAD : Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

MHDP : méta-hydroxy-diphényl

PERSYST : Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux

RTB : Racines, Tubercules, Bananes à cuire

UMR : Unité Mixte de Recherche

Sommaire

Présentation du laboratoire et de l'équipe de recherche.....	1
Introduction générale.....	2
Matériel et méthodes	5
1) Extraction des pectines	5
2) Présentation de l'automate	8
Résultats	10
1) Mise en place des conditions expérimentales.....	10
1.1. Etude du ratio d'extraction	10
1.2. Etude de l'effet de congélation des extraits.....	11
2) Etude de la fiabilité du matériel et de la méthode (reproductibilité et répétabilité).....	12
2.1. Comparaison des résultats avec des standards	12
2.2. Etude de la répétabilité	13
2.3. Reproductibilité.....	13
2.4. Points critiques de la manipulation.....	14
Discussion	17
Conclusion.....	19
Bibliographie.....	20

Présentation du laboratoire et de l'équipe de recherche

Le Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) est l'organisme français de recherche agronomique et de coopération internationale pour le développement durable des régions tropicales et méditerranéennes.



Figure 1 : logo UMR qualisud

Créé en 1984 sous le statut d'Établissement public à caractère industriel et commercial (Épic), et issu de la fusion d'instituts techniques et de recherche agronomique tropicale, le CIRAD est placé sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et du ministère de l'Europe et des Affaires étrangères.

Présent sur tous les continents dans une cinquantaine de pays, le CIRAD s'appuie sur les compétences de ses 1 650 salariés, dont 1 140 scientifiques, ainsi que sur un réseau mondial d'environ 200 partenaires.

Ses principaux axes de recherche s'articulent autour de six thématiques : la santé des animaux, des plantes et des écosystèmes en lien avec la santé publique, le développement de transitions écologiques, l'accompagnement des agricultures du Sud vers le changement climatique, l'accompagnement des systèmes alimentaires dans une transition plus durable et inclusive, ainsi que la biodiversité et des approches territoriales comme leviers de résilience et de développement durable. (1)

Le CIRAD comprend vingt-neuf unités de recherche réparties dans trois départements scientifiques : BIOS (systèmes biologiques), PERSYST (performances des systèmes de production et de transformation tropicaux), et ES (environnements et sociétés). (2)

J'ai réalisé mon stage de fin d'études au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) QUALISUD (figure n°1) (démarche intégrée pour l'obtention d'aliments de qualité), elle-même rattachée au département PERSYST.

Les systèmes alimentaires dans les régions tropicales et méditerranéennes sont contraints d'évoluer du fait de l'urbanisation, de l'intensification des échanges internationaux, et des changements de mode de vie, impliquant une forte demande en aliments et une évolution des exigences des consommateurs locaux. (3)

L'UMR QUALISUD accompagne et consolide les filières agroalimentaires des pays du Sud et amène vers des modes de consommation plus équilibrés par le biais de systèmes alimentaires durables. Elle mène des études pour améliorer et optimiser les procédés de transformation des ressources alimentaires locales, en prenant en compte les différentes composantes de la qualité des aliments (sensorielle, nutritionnelle, sanitaire et bénéfiques santé) tout au long de leur transformation.

L'UMR est composée de six équipes de recherche, mon stage s'est déroulé au sein de l'équipe 3 « Ingénierie des produits et procédés durables ». Les chercheurs y sont mobilisés autour de l'étude

de l'évolution (comportement, composition et structure) de la matrice alimentaire, au cours de son élaboration et/ou de sa transformation. L'objectif est d'identifier les attributs critiques de la qualité des matières premières. Les orientations des recherches consistent en une meilleure prise en compte des différentes échelles (caractérisation macroscopique, comportement rhéologique, composition moléculaire, type de cellules et structuration des tissus) de la matrice alimentaire afin d'identifier l'impact de la nature de cette matrice sur son évolution au cours de la transformation et du stockage. (4).

Introduction générale

Mon stage de fin d'études a été proposé dans le cadre du projet RTBfoods. (Amélioration des Racines, Tubercules et Bananes à cuire RTB pour une meilleure qualité des produits finis en lien avec les préférences des utilisateurs). Il consiste en la mise au point et l'optimisation d'une méthode automatisée de dosage des pectines dans des produits amylicés, principalement le manioc et l'igname. Les résultats de ces dosages serviront à valider ou non le fait que les pectines possèdent un rôle prépondérant dans l'adhésion inter-cellulaire et par conséquent, sur les propriétés texturales et le comportement de ces plantes-racines en cuisson.

En plus d'être particulièrement résistantes, les plantes-racines apportent un grand nombre de nutriments : celles-ci sont surtout chargées en fécule (amidon) et contiennent également des vitamines et des minéraux. Elles tiennent une grande place dans l'alimentation des populations importantes dans les pays tropicaux car elles sont consommées comme principale source de calories peu coûteuses. Certes, l'énergie apportée est trois fois plus importante pour les céréales (car les tubercules sont très riches en eau), mais ce faible apport énergétique est compensé par les forts rendements de production des plantes-racines sur les terres arides d'Afrique. (5)

Le manioc est un produit alimentaire de base pour une grande partie d'Africains. En effet, celui-ci peut se contenter de sols pauvres et de pluies très faibles. En outre, il est synonyme de sécurité alimentaire pour ces populations. (6)

Ce projet, principalement financé par la fondation *Bill & Melinda Gates* lancé en 2017 et s'étalant sur cinq ans, vise à identifier les traits de qualité qui conditionnent l'adoption des nouvelles variétés dans cinq pays d'Afrique (Bénin, Cameroun, Côte d'Ivoire, Nigeria, Ouganda).

L'objectif général est d'abord d'assurer une adoption plus large des variétés améliorées, tout en garantissant la sécurité alimentaire et le revenu des agriculteurs locaux. Ce projet participatif, associant à la fois chercheurs, scientifiques et consommateurs locaux visera à une meilleure prise en compte des préférences des populations au niveau de l'appétit à la cuisson, du goût, et de la texture des aliments en question. En effet, les variétés « élite » possédant un très bon rendement au champ, une bonne résistance aux maladies et au réchauffement climatique se révèlent finalement peu appréciées des consommateurs et peu adaptées aux traditions culinaires fortement ancrées dans la culture. Cette approche novatrice aura comme but final d'intégrer les critères de qualité ainsi établis à partir des préférences des consommateurs, pour les intégrer durablement dans des programmes de sélection. (7)

Pour répondre aux objectifs du projet, celui-ci s'articule autour de cinq grands axes de recherche balayant l'ensemble des problématiques (à la fois scientifiques, sociales et économiques) rencontrées lors de l'adoption de nouvelles variétés de RTB.

Mon stage s'est déroulé dans le second axe du projet, chargé d'établir un lien entre les préférences des consommateurs (préférence de texture, de goût, de cuisson...) et comment ces critères se traduisent en données biochimiques et/ou biophysiques (quantité de fibres, d'amidon...). Il s'est plus particulièrement orienté vers la composition biochimique des produits amylicés et comment celle-ci affecte l'acceptabilité et la qualité du produit. En effet, lors de la cuisson, de nombreuses réactions se produisent au sein des cellules végétales comme la gélatinisation de l'amidon, le gonflement des cellules, la dégradation des pectines...

La pectine, considérée comme un des composants clé de l'architecture de la paroi cellulaire chez les végétaux (figure n°2), est un polysaccharide se trouvant dans la lamelle moyenne et ayant comme principal monomère l'acide galacturonique (figure n°3), qui est un sucre possédant une fonction acide carboxylique. D'autres monomères de sucre la composent, mais ils sont minoritaires par rapport à l'acide galacturonique. Elles jouent un rôle crucial dans l'adhésion inter-cellulaire, et par conséquent dans le comportement d'un aliment en cuisson.

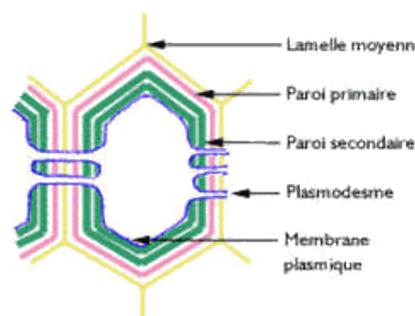


Figure 2 : schéma cellule végétale

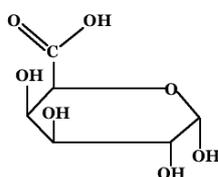


Figure 3 : molécule d'acide galacturonique

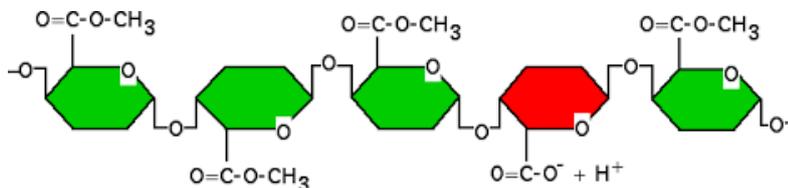


Figure 4 : polymère d'acide galacturonique avec monomères méthylés en vert

La chaîne principale des pectines, représentant 65% du réseau glucidique est un polymère d'acide galacturonique reliés par des liaisons osidiques en α (1-4). La fonction acide carboxylique de ce dernier, est le siège de nombreuses réactions chimiques et enzymatiques : certains monomères peuvent être méthylés. Selon la proportion de méthylation, la chaîne est plus ou moins acide. (8) (figure 4). On distingue trois catégories de pectines. Si leur degré de méthylation est inférieur à 5%, on parle d'acides pectiques. Ensuite, selon si le degré de méthylation est inférieur ou supérieur à 50%, on parlera de pectines faiblement/hautement méthylées. (9)

Lorsque deux portions de chaînes sont constituées d'acide galacturonique non méthylé, elles peuvent se lier avec des ions calcium comme dans le schéma ci-dessous. Ce complexe formé est dit en boîte à œuf ou « egg-box » (figure 5). Plus il y a des chaînes liées par le calcium, plus les pectines donneront une texture de « gel », et vice-versa donneront une texture plus fluide lorsque les ions sont chélatés. L'hypothèse émise par l'équipe de recherche est

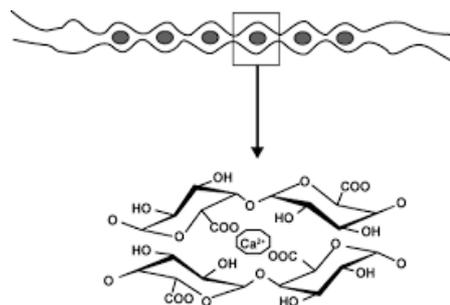


Figure 5 : Modèle de la boîte à œuf

que cette structure en boîte à œuf influe sur le comportement d'un aliment en cuisson. En effet, la cohésion entre cellules serait « plus forte » et empêcherait une dépolymérisation rapide du réseau de pectines qui est responsable de l'attendrissement des aliments en cuisson. Nous pensons qu'une variété est « bonne » (avec une cuisson rapide et une texture fondante) lorsqu'elle possède beaucoup de pectines méthylées et peu de pectines non méthylées. (10)

Pour illustrer cette hypothèse, l'équipe de recherche a conduit des tests préliminaires sur 6 échantillons contrastés de manioc. Les variétés avaient été préalablement sélectionnées en fonction de leur temps de cuisson et de leur texture (deux variétés « bonnes », deux variétés « moyennes » et deux variétés « mauvaises »). D'après les résultats, les variétés dites « mauvaises » possédaient beaucoup de pectines non méthylées à l'inverse de celles cuisant vite.

		Pectines totales	Pectines méthylées	Pectines non méthylées
		pH 10+EDTA 0,05M	pH 10	(pH 10 +EDTA)- (pH 10)
	Nom variété	Conc. Acide gal. (mg/100g)		
Bonne cuisson	MPER183	791	680	111
	MIND135	760	686	74
Cuisson moyenne	PAN70	635	553	82
	VEN218	726	603	123
Mauvaise cuisson	VEN25	772	460	312
	BRA512	921	393	528

Tableau 1 : résultats obtenus en 2020 sur six variétés de manioc avec 100 mg de farine (moyenne de 2 résultats)

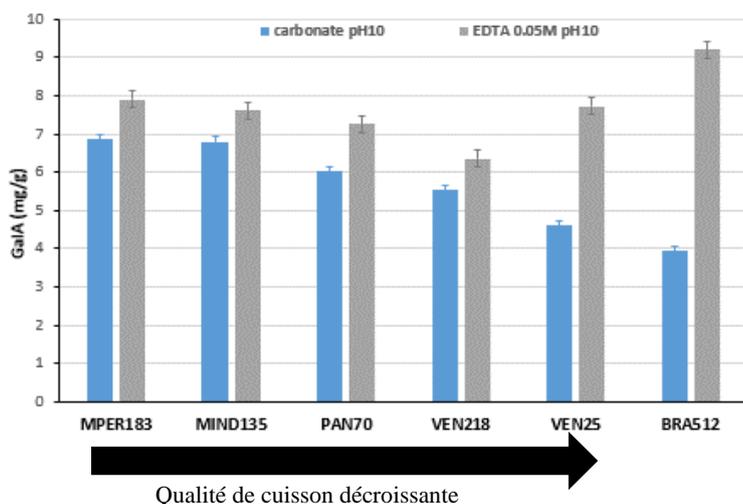


Figure 6 : histogramme représentant les teneurs en acide galacturonique dans différentes conditions dans des variétés de manioc

On observe alors pour les deux variétés dites « mauvaise » une très grande différence entre la concentration en acide galacturonique totale et la concentration en acide galacturonique. Cette différence correspond donc aux pectines non méthylées. C'est le contraire pour les « bonnes variétés »

Mon rôle pendant le stage a tout d'abord été de valider et d'optimiser la méthode de dosage des pectines automatisée ainsi que leur extraction sur des échantillons de farine, tout en identifiant les points critiques de la

méthode. Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur l'hypothèse émise en début de projet, afin de juger si celle-ci s'applique à d'autres échantillons de manioc et d'igname.

Nous nous intéresserons dans ce rapport au protocole de dosage et d'extraction des pectines en méthode automatisée et à sa fiabilité, tout en analysant la répétabilité, la reproductibilité, la justesse et les points pouvant affecter les résultats des dosages.

Matériel et méthodes

1) Extraction des pectines

Le dosage des pectines au MHDP a été réalisé en suivant le protocole mis au point par l'équipe de recherche et par les ingénieurs de la société *Skalar* commercialisant l'automate.

Partant du constat que dans les échantillons de RTB, la quantité de sucres neutres est 80 fois supérieure à celle des pectines, l'enjeu était de mettre au point une méthode permettant d'extraire prioritairement ces pectines acides, et non les sucres neutres. C'est pourquoi nous avons travaillé sur des conditions d'extraction optimales pour extraire les sucres acides ainsi que sur la méthode de dosage au MHDP, ce réactif possédant une affinité cinquante fois supérieure avec les sucres acides qu'avec les sucres neutres.

Le réactif colorimétrique utilisé, le MHDP, est un composé aromatique réagissant avec les fonctions carboxyle des acides uroniques. Il a l'avantage d'être spécifique des sucres acides et d'être plus sensible que la carbazole. (11).

La molécule de pectine doit d'abord être dépolymérisée et ainsi subir une hydrolyse acide pour pouvoir libérer des monomères d'acide galacturonique pouvant réagir avec le MHDP. Cette hydrolyse se fait grâce à de l'acide sulfurique pur à 97%, chauffé à 98°C. En milieu acide fort et à chaud, les oses possédants au moins 5 carbones subissent une déshydratation interne avec cyclisation, produisant un composé furfuralique (furfural ou un de ses dérivés). (figure 7) (12)

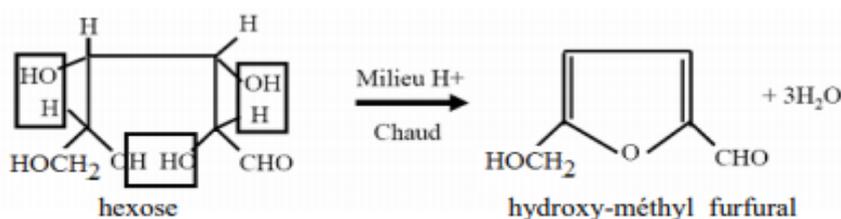


Figure 7 : réaction de déshydratation en milieu acide

Ces composés furfuraliques ont la capacité de se condenser avec des phénols pour former des complexes colorés. Dans notre cas, la réaction avec le 3-phényl-phénol (figure 8) va donner un complexe coloré rose fuchsia, dont l'intensité mesurable par spectrophotométrie est proportionnelle à la quantité d'acide galacturonique de l'extrait.

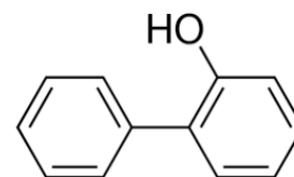


Figure 8 : molécule de 3-phényl-phénol

Les pectines étant retenues dans la paroi des cellules végétales, nous avons une nécessité de dégrader celles-ci pour les libérer.

Compte tenu des différentes formes potentielles des groupements acides carboxyliques (méthylés, neutres ou ionisés), différentes conditions d'extraction doivent être utilisées pour

recupérer l'ensemble des pectines. Nous utiliserons dans notre protocole trois conditions d'extraction des pectines :

- pH 10
- pH 10 + EDTA 0,05 M
- pH 6,5 + EDTA 0,05M : (Cette condition sert à extraire les pectines libres. Elle est réalisée en plus pour élargir nos hypothèses mais ne nous intéressera pas vraiment dans ce rapport).

En effet, à pH basique, se produit une trans-élimination entre les ions hydroxyde et l'hydrogène porté par le carbone 5, conduisant à une perte d'électron, formation d'une double liaison C4-C5 et rupture de la liaison glycosidique. (figure 9). Cette réaction chimique n'étant faisable qu'en présence d'acide galacturonique méthylé (le groupement méthyle rendant l'hydrogène labile), à pH 10, nous extrayons les pectines méthylées. (13)

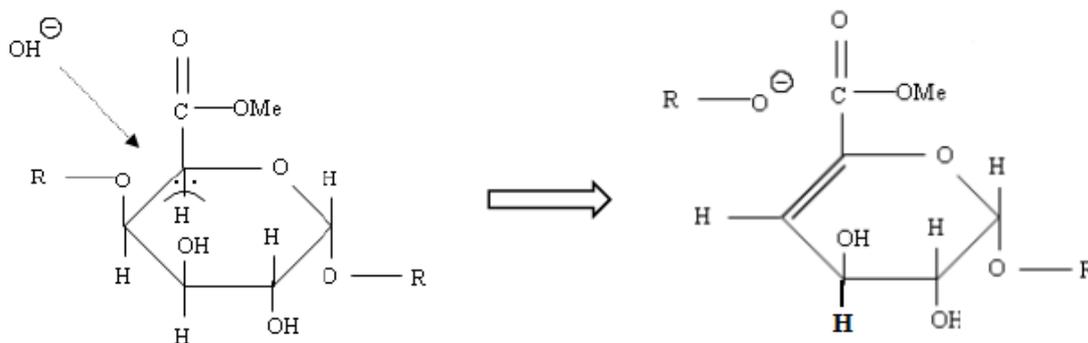


Figure 9 : Réaction de la β-élimination

L'ajout d'un agent chélateur (EDTA) dans le tampon d'extraction va permettre, en piégeant les ions calcium, de détruire les boîtes à œufs formées, et de récupérer les pectines non méthylées. Grâce au tampon pH 10 + EDTA 0,05M, nous récupérons la totalité des pectines présentes dans l'extrait. Nous pourrions ensuite obtenir la teneur en pectines non méthylées de l'échantillon par un calcul :

$$\text{Pectines non méthylées} = \text{pectines}_{(\text{pH } 10 + \text{EDTA } 0,05\text{M})} - \text{pectines}_{(\text{pH } 10)}$$

Solution de NaOH à 4M

Cette solution de soude concentrée servira à ajuster le pH des différents tampons d'extraction. Peser 40 g de NaOH en pastilles puis les dissoudre dans 250 ml d'eau.

Tampon d'extraction pH 10

- Solution A (Na₂CO₃ à 0,05 M) :

Peser environ exactement 3.1g de carbonate de sodium monohydraté dans 200 ml d'eau distillée. Agiter jusqu'à dissolution complète puis compléter à 500ml avec de l'eau distillée

- Solution B (NaHCO₃ à 0,05M) :

Peser environ exactement 2,1 g de bicarbonate de sodium puis les dissoudre dans 500 mL d'eau distillée.

Pour préparer la solution tampon carbonate pH10, mélanger 275 mL de la solution A avec 225 mL de la solution B. Mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre, puis ajuster au besoin avec une des deux solutions jusqu'à arriver à un pH de 10.

Tampon d'extraction pH 10 + EDTA 0,05M

Peser environ exactement 14,612 g d'EDTA, puis les diluer dans 200 mL d'eau distillée. Mesurer le pH, puis ajouter petit à petit des volumes de solution de NaOH concentrée à 4 M (environ 50 mL) pour arriver à un pH de 10. Compléter à 1L jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Tampon d'extraction pH 6,5 + EDTA 0,05 M

Procéder de la même manière que le tampon d'extraction pH 10 + EDTA, mais arriver à un pH de 6,5.

Lorsque les solutions tampons sont prêtes, nous pouvons passer à l'étape d'extraction des pectines.

Dans des tubes *Falcon*® de 50 mL, peser environ exactement 250 mg de farine de manioc / igname, puis ajouter 10 mL de tampon d'extraction. Immerger les tubes dans un bain marie chauffé à 55°C en position couchée, puis laisser l'extraction se faire pendant 60 minutes avec agitation. La température de 55°C est idéale pour extraire les pectines. Au-delà de 59°C, l'amidon se gélatinise, au risque d'extraire des sucres neutres qui pourraient interagir avec le réactif colorimétrique.(14)

Centrifuger les tubes *Falcon*® 10 minutes à 4000 g puis récupérer le surnageant en prenant soin de ne pas toucher ni de ne pas prélever de culot. Transférer ce surnageant dans des tubes *Falcon*® de 15 mL. Les échantillons sont prêts à être analysés par l'automate.

Solution de MHDP :

Peser environ exactement 1,25g de NaOH en pastille et les dissoudre dans un volume d'eau distillée de 125 mL. Peser environ exactement 100 mg de 3-phényl-phénol, puis les dissoudre dans le mélange. Enfin, compléter jusqu'à 250 mL avec de l'eau distillée. Protéger la solution de papier aluminium. Celle-ci se conserve une semaine maximum à température ambiante.

Comme dans tout dosage colorimétrique, pour pouvoir retrouver la concentration en acide galacturonique de nos échantillons, il est nécessaire de préparer une gamme étalon couvrant l'ensemble du domaine de concentration en acide galacturonique d'échantillons végétaux. Celle-ci se prépare à partir d'une solution mère d'acide galacturonique très concentrée et qui peut se conserver plusieurs mois à 4°C, du fait de sa grande stabilité.

Solution mère d'acide galacturonique :

Diluer 500 µL d'une solution de soude concentrée à 1M dans un peu d'eau distillée. Peser environ exactement 1,126g d'acide galacturonique monohydraté (pureté à 97%) puis les ajouter au mélange. Compléter à 100 mL jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Conserver cette solution stock au réfrigérateur.

Préparer la gamme d'étalonnage comme suivant :

N° tube	1	2	3	4	5	6	7
Concentration acide galacturonique (mg/L)	25	50	80	160	240	320	400
Volume solution mère (mL)	0,25	0,5	0,8	1,6	2,4	3,2	4
Qsp eau distillée (mL)	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 2 : Préparation de la gamme d'étalonnage d'acide galacturonique

Aliquoter les différents points de la gamme d'étalonnage, en conservant une quantité nécessaire au réfrigérateur (moins stable) et une autre au congélateur (stable)

2) Présentation de l'automate

Tous les dosages d'acide galacturonique dans les échantillons de manioc et d'igname ont été réalisés à l'aide d'un automate appelé « analyseur de flux continu ».

En effet, la méthode manuelle du dosage des pectines est plutôt contraignante à utiliser et nécessite des temps de réaction très précis et compliqués à respecter, entraînant parfois une faible reproductibilité. De plus, l'hydrolyse à l'acide sulfurique pur à 98°C reste dangereuse pour le manipulateur.

Pour pallier ces inconvénients, le CIRAD a donc investi dans un analyseur de flux continu. (figure 10)



Figure 10 : Analyseur de flux continu

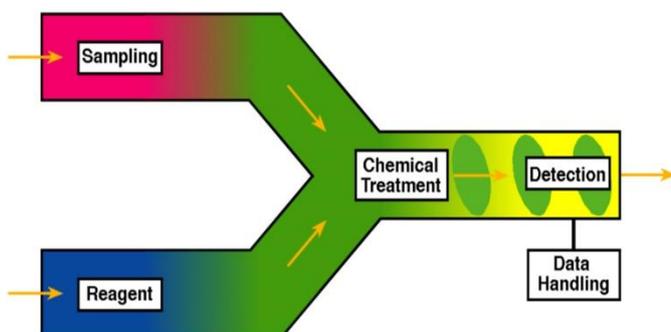


Figure 11 : Schéma du principe de flux continu

Son principe peut être comparé au système de circulation du corps humain, le flux sanguin (figure 11). Le flux du système est composé des réactifs nécessaires au dosage des pectines (acide sulfurique, solution de MHDP, eau distillée) provenant de flacons. Les échantillons à analyser sont pipetés par une aiguille et mélangés avec les réactifs dans une

bobine en verre (figure 12). Au cours de l'analyse, des contrôles et étalons sont introduits à l'aide d'une séquence de travail/ table à définir sur le logiciel de pilotage. Des bulles d'air séparent le flux en petits segments afin d'améliorer le mélange et d'éviter les contaminations inter-échantillons.

Enfin, le produit coloré est analysé par un spectrophotomètre UV-visible mesurant l'absorbance à 530 nm.

Les temps de réaction sont parfaitement contrôlés grâce à des capillaires aux diamètres et aux débits fixés prélevant les réactifs nécessaires au dosage colorimétrique des pectines. Le pompage des réactifs et échantillons se fait à l'aide d'une pompe péristaltique (figures 13 et 14). Les tuyaux de pompe se retrouvent écrasés entre le rouleau tournant à une vitesse de 6 tours/ minutes et le lit de pompe. Le débit de réactifs est donc corrélé aux diamètres des capillaires. Plus il est important, plus le débit est grand. (15)

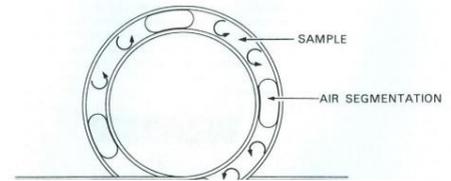


Figure 12 : Schéma de la bobine de mélange

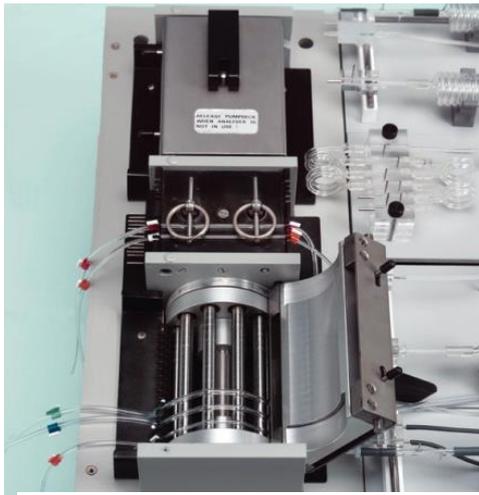


Figure 13 : photo de la pompe péristaltique

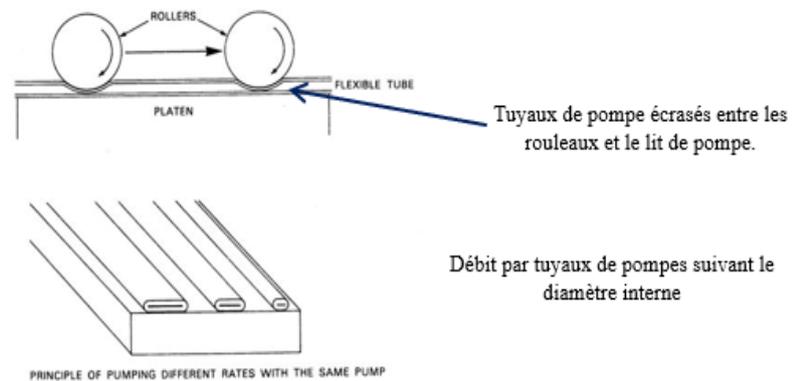


Figure 14: Schéma du principe de la pompe péristaltique

Voici une représentation schématique de l'analyseur de flux continu :

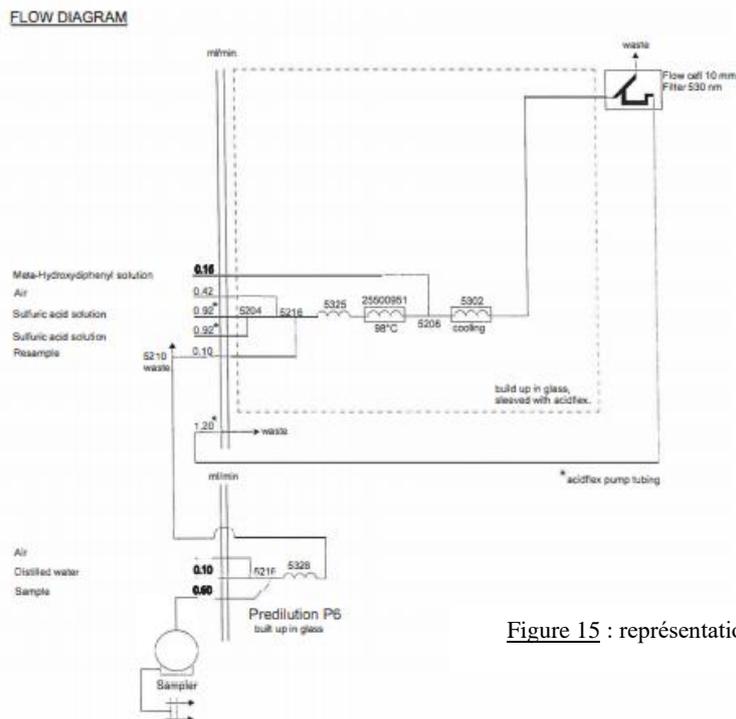


Figure 15 : représentation schématique de l'analyseur de flux continu

Nous retrouvons sur ce schéma les différents réactifs nécessaires au dosage des pectines, les bobines de mélange, ainsi que les débits des capillaires en ml/min. A la fin du parcours, l'échantillon passe devant une cellule de mesure d'absorbance. Cette absorbance est traduite par le logiciel en « hauteur corrigée », prenant la forme de pics et calculée par rapport au signal d'absorbance le plus fort, et le plus faible (ligne de base). Dans notre échantillon, d'autres composés absorbent minoritairement à 530 nm. De ce fait, nous ne prenons pas en compte l'aire totale du pic mais seulement sa hauteur maximale correspondant à la plus grande absorbance, résultant de la réaction spécifique entre le MHDP et l'acide galacturonique.

Résultats

1) Mise en place des conditions expérimentales

Dans le cadre de mon stage, nous avons décidé de nous focaliser sur deux paramètres pour la mise en place des conditions expérimentales de notre méthode : L'effet du ratio farine/volume d'extraction sur les teneurs en pectines extraites, ainsi que l'effet de congélation sur la teneur des extraits. Nous avons également voulu traduire notre méthode avec des indicateurs de justesse et de reproductibilité. Les autres paramètres associés à l'extraction comme sa température et sa durée (1h à 55°C), la molarité en EDTA, l'absence d'ions Ca^{2+} , et la valeur du pH de 10 ont été préalablement testés et validés par l'équipe. Ces paramètres sont constants. Avec l'équipe encadrante nous avons décidé de conduire les expérimentations sur des échantillons de manioc connus pour être très contrastés de par leur aptitude à la cuisson (valeurs de texture ou temps de cuisson donnés par nos partenaires). Ainsi, nous avons à notre disposition des échantillons que l'on qualifiera de bonne et de mauvaise aptitude à la cuisson

1.1. Etude du ratio d'extraction

Au cours de mes premières manipulations, mon travail a été d'analyser les six variétés de manioc précédemment étudiées par l'équipe de recherche fin 2020. Les échantillons ont été dosés avec la même méthode, le seul paramètre modifié étant le manipulateur.

Lors des extractions de pectines à partir des farines de manioc, plusieurs masses ont été testées (100,250,500 et 1000 mg). Il a été déterminé que les extractions étaient optimales à 100 et 250 mg, mais toujours avec une extraction légèrement plus faible à 250 mg, surtout pour la condition pH 10.

Le ratio farine/volume de tampon d'extraction est un point important à optimiser car nous souhaitons développer une méthode qui soit la plus discriminante entre nos échantillons. Ainsi, lorsque nous augmentons la quantité de farine lors de l'extraction, nous augmentons la quantité de sels de l'extrait. Ces sels, provenant des racines de RTB, peuvent interagir avec le milieu d'extraction et empêcher une extraction optimale dans certaines conditions. Nous choisirons donc le ratio d'extraction correspondant à la plus grande différence entre bonne et mauvaise aptitude à la cuisson.

		Pectines totales		Pectines méthylées		% d'écart en teneur entre ratios	
		pH 10 + EDTA 0,05 M		pH 10		pH 10 + EDTA 0,05 M	pH 10
	Nom variété	Conc ac gal. (mg/100g) 100mg	250 mg	Conc ac gal. (mg/100g) 100mg	250 mg		
Bonne cuisson	MPER183	763	734	699	652	4	7,2
	MIND135	759	701	740	622	8,3	19
Cuisson moyenne	PAN70	770	643	666	531	19,8	25,4
	VEN218	657	570	577	478	15,3	20,7
Mauvaise cuisson	VEN25	825	684	707	535	20,6	32,2
	BRA512	942	840	782	547	12,1	43

Tableau 3 : résultats teneur en acide galacturonique obtenus à pH 10 + EDTA 0,05 M et à pH 10 avec deux ratios d'extraction en avril 2021 (moyenne de 2 résultats)

Nous pouvons déjà constater que comme escompté et décrit dans la littérature, les sels jouent un rôle d'inhibiteurs dans l'extraction des pectines dans ces conditions. De plus, nous pouvons voir dans le tableau ci-dessus que l'écart est d'autant plus important pour les variétés possédant une mauvaise aptitude à la cuisson. C'est pour cela que pour la suite des expérimentations ce ratio de 250 mg de farine pour 10 mL de tampon d'extraction sera considéré comme fixe pour les essais réels.

1.2. Etude de l'effet de congélation des extraits

L'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué mon stage avait pour habitude logistique de réaliser les différentes extractions dans la semaine et de lancer les différentes mesures sur le Skalar de façon groupée après congélation des échantillons. Après discussion et échanges avec d'autres laboratoires partenaires du projet, il a été décidé de s'intéresser à cet effet. Nous avons donc réalisé des extractions sur les six échantillons de manioc contrastés comme décrit ci-dessus puis nous avons les avons aliquoté en deux fractions : la première étant analysée en suivant l'extraction et l'autre après une congélation de quelques jours à -20°C. Voici ci-dessous un tableau récapitulatif des données : obtenus :

		pH 10 + EDTA 0,05M			pH 10		
	Nom variété	Conc ac gal. (mg/100g) AVANT congélation	Conc. Ac. Gal. (mg/100g) APRES congélation	% d'écart entre avant et après congélation	Conc ac gal. (mg/100g) AVANT congélation	Conc. Ac. Gal. (mg/100g) APRES congélation	% d'écart entre avant et après congélation
Bonne cuisson	MPER183	763	771	-1,2	699	703	-0,6
	MIND135	759	775	-2,1	740	635	16,5
Cuisson moyenne	PAN70	770	724	6,4	666	701	-5
	VEN218	657	693	-5,2	577	692	-16,2
Mauvaise cuisson	VEN25	825	789	4,6	706	714	-1,2
	BRA512	942	883	6,7	882	924	-4,55

Tableau 4 : Résultats des teneurs en pectines avant et après congélation des extraits

Ces premiers essais n'ont pas montré de tendance réelle, à savoir que la teneur augmente ou diminue peu importe les conditions. Ainsi, pour s'affranchir d'un potentiel biais de mesure, sachant que nos teneurs sont assez faibles, nous avons opté pour une mesure directement après l'extraction bien que la logistique expérimentale associée à ce choix soit plus lourde.

2) Etude de la fiabilité du matériel et de la méthode (reproductibilité et répétabilité)

2.1. Comparaison des résultats avec des standards

Après avoir défini la méthode de façon complète, nous avons décidé de confronter nos résultats avec des échantillons standards. Ces échantillons standards sont des échantillons purifiés en pectine de pomme et citron.

L'intérêt de ces échantillons est double car on va pouvoir confronter nos résultats avec les valeurs commerciales et également valider notre méthode avec des échantillons possédant des hautes teneurs en pectines (75% vs 1% environ dans les RTB).

Compte tenu des différences significatives des teneurs en pectine, nous avons dû adapter la valeur des prises d'essais et ajouter une étape de dilution pour obtenir des absorbances de ces échantillons comprises dans les absorbances de la gamme d'étalonnage.

citron						
	masse pesée (mg)	hauteur corrigée	teneur (g/100g)	moyenne	ecart type	coef var
pH 10 EDTA -1	23,6	0,6385	89	89	0,7	0,8
pH 10 EDTA-2	24,8	0,6632	88			
pH 10 - 1	26,5	0,5606	70	73	4,1	5,7
pH 10 -2	24,2	0,5549	75			
pH 6.5 -1	26,5	0,5004	62	60	3,4	5,8
pH 6.5-2	28,2	0,4907	57			

pomme						
	masse pesée (mg)	hauteur corrigée	teneur (g/100g)	moyenne	ecart type	coef var (%)
pH 10 EDTA -1	25,1	0,6545	86	87	1,0	1,1
pH 10 EDTA-2	25,7	0,6811	87			
pH 10 - 1	25,7	0,5698	73	71	2,1	3,0
pH 10 -2	29,6	0,6294	70			
pH 6.5 -1	27,4	0,5189	62	62	0,5	0,8
pH 6.5-2	22,6	0,423	62			

Tableau 5 : Résultats de teneur en pectines sur des standards d'acide galacturonique

Les résultats obtenus nous permettent de valider que notre extractibilité des pectines est quantitative. Nous voyons des différences entre nos conditions, donc elle est également sélective. Et comme attendu, les valeurs suivent la logique pH 10 + EDTA supérieures à pH 10. Pour aller plus loin dans cet aspect sélectivité de la méthode, et donc pouvoir remonter à la notion de degré de

méthylation des pectines, l'équipe encadrante va essayer d'acquérir des standards de pectines avec des degrés de méthylations différents. L'ajout d'une dilution supplémentaire dans le protocole ne semble pas avoir eu d'effets sur nos résultats, ce qui prouve que notre méthode est fiable et peut être utilisée sur diverses variétés, à condition d'en adapter le protocole.

2.2. Etude de la répétabilité

Dans cette première étape, nous avons voulu nous intéresser à l'erreur systématique de l'automate. Ainsi, dans cette section nous avons injecté deux fois le même échantillon extrait. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

		pH 10 + EDTA 0,05 M				pH 10			
	Nom variété	Conc ac gal. (mg/100g) (1)	Conc. Ac. Gal. (2)	Ecart type	Coefficient de variation (%)	Conc ac gal. (mg/100g) (1)	Conc. Ac. Gal. (2)	Ecart type	Coefficient de variation (%)
Bonne cuisson	MMAL3	856	819	26,2	3,1	767	785	12,7	1,6
	MEX2	742	720	15,6	2,1	638	644	4,2	0,7
Cuisson moyenne	CM2600-2	598	643	31,8	5,1	485	513	19,8	4
	IND27	658	669	7,8	1,2	571	569	1,4	0,2
Mauvaise cuisson	MAL3	702	671	21,9	3,2	648	650	1,4	0,2
	COL1468	603	580	15,6	2,6	527	536	6,4	1,2

Tableau 6 : Résultats de la répétabilité de l'automate

Nous pouvons conclure l'erreur variant de 1 à 3 % est conforme à l'incertitude que l'on retrouve en général sur des passeurs de tels équipements.

2.3. Reproductibilité des résultats

Lors de cette étape, nous nous sommes intéressés à la reproductibilité de la méthode. Pour cela, nous avons réalisé deux mêmes extractions, dans les mêmes conditions (même équipement, mêmes échantillons, même laboratoire) mais sur deux jours différents. Les résultats générés sont le fruit d'une moyenne de 2 valeurs, et proviennent de six nouvelles variétés de manioc aux comportements de cuisson très contrastés.

		Pectines totales				Pectines méthylées			
		pH 10 + EDTA 0,05 M				pH 10			
	Nom variété	Conc ac gal. (mg/100g) Rep 1	Conc ac gal. (mg/100g) Rep 2	Ecart type	Coefficient de variation (%)	Conc ac gal. (mg/100g) Rep 1	Conc ac gal. (mg/100g) Rep 2	Ecart type	Coefficient de variation (%)
Bonne cuisson	MMAL3	840	856	11,3	1,3	807	767	28,3	3,6
	MEX2	701	742	29	4	643	638	3,5	0,6
Cuisson moyenne	CM2600-2	598	598	0	0	528	485	30,4	6
	IND27	649	658	6,4	1	587	571	11,3	2
Mauvaise cuisson	MAL3	700	702	6,4	0,2	645	648	2,1	0,3
	COL1468	612	603	1,4	1	561	527	24	4,4

Tableau 7 : Résultats de la reproductibilité de la méthode

Pour conclure sur la reproductibilité de notre méthode, nous pouvons affirmer que celle-ci est conforme. Entre autres, nous obtenons des coefficients de variation relativement satisfaisants, lorsque ceux-ci sont habituellement acceptables entre 5 et 10 % pour ce type d'analyses au vu de la somme des différentes étapes que comporte la méthode.

2.4. Points critiques de la manipulation

2.4.1 Stabilité des réactifs.

Lors des différentes manipulations que j'ai pu conduire, j'ai constaté que plusieurs points étaient critiques dans la conduite de la manipulation, notamment la gestion scrupuleuse des réactifs, et à la préparation (broyage et granulométrie) et au stockage des échantillons (température et durée de stockage). En effet, sur une série de trois répétitions sur des variétés de manioc, nous avons constaté que la dernière répétition donnait des teneurs en pectines toujours plus élevées que les autres., donnant des écarts type et coefficient de variation témoignant d'une série de valeurs assez dispersée.

Le jour de la troisième répétition, nous avons préparé une nouvelle solution de MHDP ainsi qu'une nouvelle gamme d'étalonnage. La solution de MHDP était déjà préparée depuis plus d'une semaine et le coefficient de détermination de la courbe d'étalonnage diminuait au fil des jours et était de l'ordre de 0,94

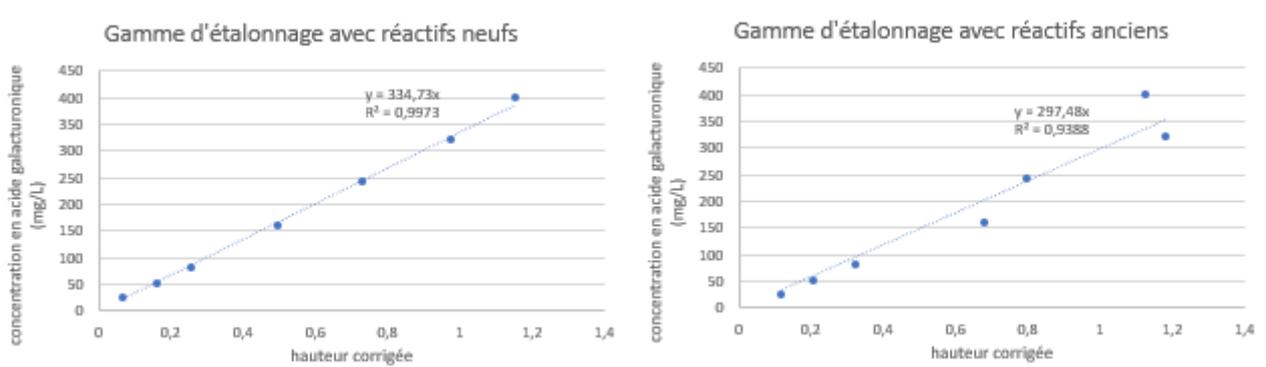


Figure 16 : courbes de gamme d'étalonnage d'acide galacturonique avec réactifs neufs vs anciens

Nous avons pensé que cette tendance de teneur plus importante en acide galacturonique pouvait être expliquée par un renouvellement de réactifs sur la répétition 3. Pour lever le doute sur cette supposition, une quatrième répétition a été réalisée avec une attention particulière sur les différents points critiques de la manipulation (température d'extraction, récupération du surnageant...)

	Nom variété	Répétition 1	Répétition 2	Moyenne rep 1-2	Répétition 3	Répétition 4	Moyenne rep 3-4
Bonne cuisson	MEX 2	673	617	645	701	731	716
	MMAL 3	740	689	715	840	838	839
Cuisson moyenne	CM2600-2	554	493	524	598	621	610
	IND27	548	563	556	649	664	657
Mauvaise cuisson	COL1468	n.d	498	n.d	612	592	602
	MAL3	599	599	599	700	687	694

Tableau 8 : Résultats obtenus à pH 10 + EDTA 0,05M sur des variétés de manioc

	Nom variété	Répétition 1	Répétition 2	Moyenne rep 1-2	Répétition 3	Répétition 4	Moyenne rep 3-4
Bonne cuisson	MEX 2	546	531	539	643	641	642
	MMAL 3	693	646	670	807	776	792
Cuisson moyenne	CM2600-2	n.d	458	n.d	528	499	514
	IND27	n.d	547	n.d	587	570	579
Mauvaise cuisson	COL1468	508	429	469	561	532	547
	MAL3	557	522	540	645	649	647

Tableau 9 : Résultats obtenus à pH 10 sur des variétés de manioc

n.d = non défini dû à une erreur de manipulation/automate.

On constate une nette tendance d'extraction plus forte pour les répétitions 3 et 4 très proches l'une de l'autre et faites avec des réactifs neufs. Nous pouvons conclure que ceux-ci ont un effet non négligeable sur les teneurs en pectines obtenues.

En traçant un graphique représentant la moyenne des répétitions 3 et 4 en fonction de la moyenne des répétitions 1 et 2, nous constatons une pente plus ou moins similaire sur les trois conditions d'extraction. Grâce à ces courbes, nous pouvons conclure qu'une solution de MHDP ainsi

qu'une gamme d'étalonnage ancienne n'affectent pas vraiment la reproductibilité de la méthode, puisque les répétitions 1 et 2 sont ressemblantes mais plutôt la justesse. Nous aurions dû en effet retrouver une pente plus ou moins égale à 1, entre ces deux moyennes si les réactifs étaient stables alors qu'ici nous retrouvons une pente qui varie entre 16 et 18%, et ceci pour toutes les conditions d'extraction.

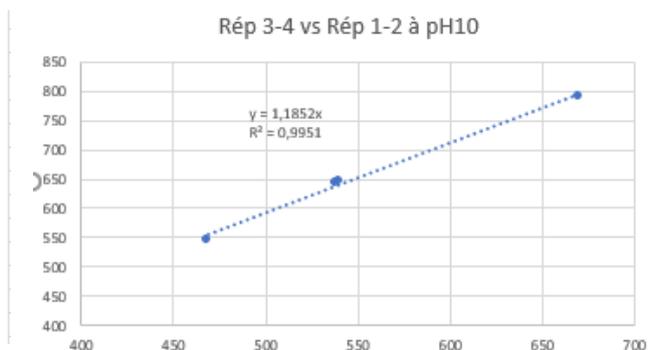
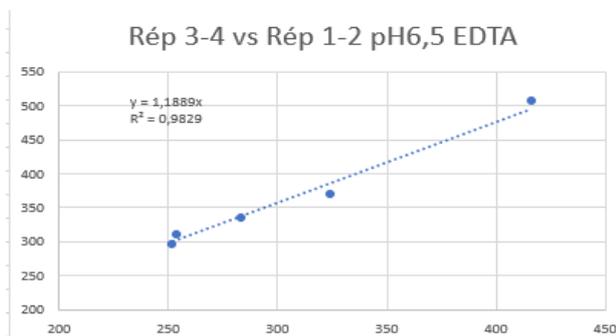
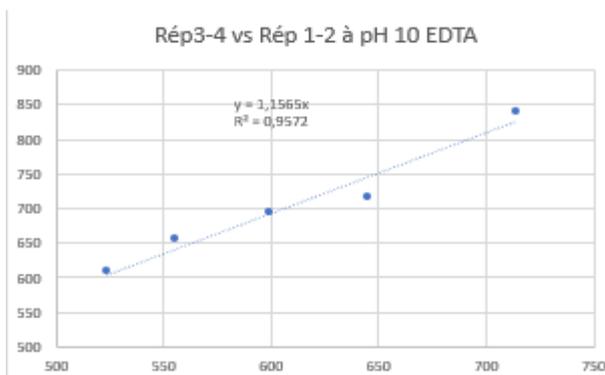


Figure 17 : courbes représentant la moyenne de teneur en acide galacturonique des répétitions 1 et 2 en fonction de la moyenne de teneur en acide galacturonique des répétitions 3 et 4

2.4.2 Points critiques sur granulométrie et stockage des échantillons

Cette partie est consacrée aux premières variétés de manioc qui avaient été préalablement analysées fin 2020 par l'équipe.

Lors de mes dosages en début de stage, nous avons directement été confrontés à plusieurs problèmes. Nous avons retrouvé des teneurs similaires à celles obtenues précédemment, sauf pour les deux variétés possédant une mauvaise aptitude à la cuisson sur la condition pH 10 (résultats en gras).

		pH 10 + EDTA 0,05 M				pH 10			
	Nom variété	Conc ac gal. (mg/100g) 2021	Résultats 2020	Ecart type	Coefficient de variation (%)	Conc ac gal. (mg/100g) 2021	Résultats 2020	Ecart type	Coefficient de variation (%)
Bonne cuisson	MPER183	763	791	19,8	2,5	699	680	13,4	1,9
	MIND135	759	760	0,7	0,1	740	686	38,2	5,4
Cuisson moyenne	PAN70	770	726	31,1	4,2	666	553	79,9	13,1
	VEN218	657	635	15,6	2,4	577	603	18,4	3,1
Mauvaise cuisson	VEN25	825	772	37,5	4,7	707	460	174,7	29,9
	BRA512	942	921	14,8	1,6	782	393	275,1	46,8

Tableau 10 : résultats de teneurs en pectines sur des mêmes variétés de manioc obtenues en 2020 et en 2021

Ces résultats sont surprenants car on ne retrouve que cette erreur uniquement sur les deux « mauvaises » variétés, d'autant plus que ces résultats sont le fruit d'une moyenne de plusieurs répétitions effectuées sur plusieurs jours proches les unes des autres pour que l'on puisse affirmer avec certitude l'exactitude des résultats.

Nous avons pu poser l'hypothèse que ces échantillons ont évolués. En effet, ils ont été stockés lyophilisés sur une très grande période à température ambiante.

Après échanges avec des partenaires du projet, nous avons conclu que ces écarts étaient vraisemblablement liés à une mauvaise conservation des échantillons. En effet, l'enzyme PME (pectine méthyl estérase), possède quand même une activité résiduelle dans les échantillons lyophilisés broyés, due à la très faible teneur en eau restante.

Les partenaires et la littérature préconisent un stockage à -20°C pendant au minimum 15 jours sur les échantillons lyophilisés non broyés. Le broyage (mise en contact intime entre enzyme et substrat) serait à réaliser au dernier moment et juste avant l'analyse des pectines.

C'est ainsi que dans le cadre de la fin de mon stage nous avons transmis ces consignes à nos partenaires et nous allons nous intéresser plus finement sur ces différents effets en jouant sur les conditions de broyage (granulométrie) et de stockage.

Discussion

Cette partie aura pour but de commenter les résultats obtenus lors de mon stage, et de souligner les problèmes rencontrés au cours des manipulations, et de mettre en lumière les points critiques de la méthode pour les améliorer par la suite.

Lors de mon stage, divers critères d'acceptabilité de la méthode automatisée de dosage des pectines au MHDP ont été testés. Dans un premier temps, nous avons déjà pu valider les paramètres physico-chimiques pour extraire l'acide galacturonique à partir de farine de manioc. Dans le cadre de l'hypothèse du projet de recherche, il était plus intéressant de travailler sur une masse de 250 mg de farine être plus discriminant quant aux concentrations en pectines non méthylées entre variétés. Nous avons ensuite pu valider la répétabilité de l'automate, la reproductibilité ainsi la justesse de la méthode même lorsque celle-ci est utilisée pour des matrices très concentrées en pectines, ce qui en fait une méthode fiable potentiellement utilisable par d'autres partenaires du projet.

Cependant, nous avons pu identifier l'un des paramètres critiques de la méthode. Le réactif de MHDP est apparu sensible à des variations chimiques dans le temps. En effet, c'est un réactif photosensible et nous nous sommes rendus compte qu'au-delà d'une semaine d'utilisation, la justesse de la méthode diminuait considérablement, affectant par la même occasion la pente et le coefficient de détermination de notre gamme d'étalonnage et donc nos résultats. Pour éviter ce phénomène à l'avenir, la solution de MHDP sera préparée toutes les semaines dans les quantités nécessaires.

Nous n'avons pas pu conclure car nous avons eu des problèmes liés à la préparation des échantillons que j'ai pu mettre en évidence lors de ces deux mois de stage. Le dernier mois permettra d'aller plus loin dans ces résultats, car nous aurons accès à des échantillons qui seront préparés en tenant compte des points critiques exposés précédemment.

Comme expliqué dans la partie résultats, j'ai d'abord travaillé sur six variétés de manioc, dont les dosages en pectines émis en 2020 confirmaient la conjecture. La méthode a été reproductible pour la quasi-totalité des variétés, sauf pour les deux « mauvaises variétés » pour lesquelles nous obtenions des résultats en total désaccord avec les premiers résultats. De ce fait, les grandes teneurs en pectines non méthylées corrélées à une mauvaise capacité de cuisson n'existaient plus et effaçaient toute distinction entre les variétés.

Suite à ces résultats non concordants, plusieurs hypothèses expliquant ces résultats ont été émises. En effet, certains des surnageants ont été analysés par l'automate après un court délai de congélation pour des raisons pratiques. Nous nous sommes demandés si cette brutale modification de température pourrait avoir un impact sur les pectines (précipitation, fermentation, dégradation enzymatique...). Cette idée n'a pas été retenue car comme nous l'avons vu précédemment, la congélation n'a pas semblé avoir d'effet sur les concentrations en pectines et n'a pu expliquer ce phénomène. De plus, nous ne pouvons affirmer avec certitude la totale fiabilité des résultats obtenus en 2020, car les divers points critiques exposés aujourd'hui n'avaient été pris en compte, donnant lieu à des conclusions hâtives.

L'autre hypothèse retenue était la possibilité d'une dégradation enzymatique. Bien que les échantillons étaient lyophilisés et sous forme de farine, ils ont été conservés à température ambiante

pendant plus d'un an. La très faible teneur en eau restante (2-3%) aurait pu expliquer l'activité potentielle de ces enzymes et donc une dégradation des pectines.

Face à cette problématique, nous avons décidé de passer sur six nouvelles variétés de manioc importées de Colombie. Comme pour les variétés précédentes, nous avons pu déduire la teneur pectines non méthylées par différence entre pectines totales et pectines méthylées :

			Teneur acide galacturonique (mg/100 g)		
	Nom variété	Temps de cuisson (minutes)	Moyenne rep 3 et 4 pH 10 EDTA	moyenne rep 3 et 4 pH 10	(pH 10 EDTA) –(pH 10) pectines non méthylées
Good cooking	MEX 2	15,5	716	642	74
	MMAL 3	15	839	791	48
Medium cooking	CM2600-2	34	609	514	95
	IND27	34,32	656	579	77
Bad cooking	COL1468	56,72	601	546	55
	MAL3	56,53	693	647	46

Tableau 11 : Résultats de teneurs en pectines obtenus sur six variétés de manioc contrastées

Encore une fois, nous ne voyons pas de différences entre les espèces. Les résultats sont surprenants d'autant plus que nous avons les plus fortes teneurs en pectines non méthylées pour les variétés moyennes et des teneurs plus faibles pour les mauvaises variétés.

En réalité, nous avons découvert lors des manipulations que les farines ont été obtenues uniquement par séchage au four à 45°C puis broyées. Il n'y a pas eu d'étape de lyophilisation comme pour les six premières espèces de manioc, ce qui signifie qu'il restait un pourcentage d'eau supérieur à 10 % de la masse totale de farine. Comme précédemment, nous ne pouvons affirmer avec certitude l'exactitude de nos résultats, à cause de potentielles dégradations enzymatiques/ fermentations.

Une analyse de granulométrie a également été réalisée afin de voir si les tailles de particules de farine étaient très différentes et pourraient expliquer ces résultats divergents, mais cette piste n'a pas été suivie puisqu'elle a montré une certaine homogénéité des broyats lyophilisés. Afin de ne pas totalement négliger cette piste, une mesure de distribution granulométrique sera couplée au dosage des pectines.

A ce stade, nous pouvons conclure que la fiabilité d'utilisation de cette méthode dosage réside plutôt dans le stockage et la condition des échantillons plutôt que dans son principe. En effet, nos farines de manioc ont subi des traitements de température, de stockage, de lyophilisation, de broyage inégaux. En effet, ce sont des éléments indispensables à prendre en compte lors du développement d'une méthode.

Nous ne pouvons pas conclure quant à la véracité de l'hypothèse. Lors des prochaines analyses, nous établirons des conditions de transformation et de stockage standardisées afin de pouvoir tirer des conclusions claires, avec l'espoir d'obtenir une tendance avec cette nouvelle préparation.

Au moment de l'écriture de ce rapport, seul des extraits de manioc ont été analysés, mais nous souhaitons élargir notre méthode de dosage à d'autres variétés de RTB dans le cadre du projet RTBfoods.

Conclusion

Au terme de ces deux mois de stage, nous avons vu développer et finalement valider la méthode de dosage automatisée des pectines dans les RTB. Nous avons pu standardiser les conditions d'extractions et tester divers paramètres nécessaires à la validation d'un protocole de dosage. Les dosages de pectines dans des variétés de manioc se sont révélés reproductibles et d'une grande répétabilité, rendant cette méthode utilisable par d'autres partenaires du projet. En revanche, l'hypothèse première des chercheurs n'a pu être validée, probablement face aux divers problèmes que nous avons rencontrés sur les matrices à analyser au cours des manipulations.

A ce stade du stage, nous ne pouvons tirer des conclusions, la durée des manipulations étant trop courte pour répondre à tous les objectifs, d'autant plus que la partie sur les ignames n'a pas pu être traitée.

Le stage que j'ai réalisé au CIRAD entre dans un projet de recherche. Il m'a permis de découvrir cette sphère particulière, dans laquelle un projet évolue au grès des avancées. Ce domaine m'a donc particulièrement plu, car j'aime l'idée de débiter sur un sujet peu développé et de développer ses connaissances au cours des expérimentations. J'ai également découvert le milieu de l'ingénierie agroalimentaire dans tous ses aspects grâce à des rencontres, hors de mon cadre de stage. Cela m'a permis d'élargir mon champ de vision par rapport au métier de technicien de laboratoire. Cette première expérience me conforte dans l'idée de vouloir évoluer dans le milieu de la Recherche et du Développement.

Pour conclure, cette première expérience dans le monde du travail a été très positive et enrichissante en tout point de vue. Cela confirme en outre mon désir de poursuivre mes études.

Bibliographie

- (1) Démarche intégrée pour l'obtention d'aliments de qualité | Cirad. <https://www.cirad.fr/nous-connaître/unites-de-recherche/qualisud>. (consulté le 10/05/21)
- (2) Thématiques de recherche / Ingénierie des produits et procédés durables - QualiSud - Démarche intégrée pour l'obtention d'aliments de qualité. <https://umr-qualisud.cirad.fr/equipes-de-recherche/ingenierie-des-produits-et-procedes-durables/thematiques-de-recherche>. (consulté le 10/05/21)
- (3) Le Cirad en bref | Cirad. <https://www.cirad.fr/nous-connaître/le-cirad-en-bref>. (consulté le 07/05/21)
- (4) Unités de recherche | Cirad. <https://www.cirad.fr/nous-connaître/unites-de-recherche>(consulté le 07/05/21)
- (5) Racines, tubercules, plantains et bananes ... - Valeur nutritive. <http://www.fao.org/3/t0207f/T0207F06.htm#Chapitre%204:%20Valeur%20nutritive>. (Consulté le 17/05/21)
- (6) « Le manioc nourrit l'Afrique ». Afrik.com, 17 juillet 2011, <https://www.afrik.com/le-manioc-nourrit-l-afrique>. (consulté le 17/05/21)
- (7) Lancement réussi du Projet RTB Foods / Actualités - Direction régionale du Cirad - Afrique Centrale. <https://afrique-centrale.cirad.fr/actualites/lancement-reussi-du-projet-rtb-foods>. (consulté le 07/05/21)
- (8) Les pectines. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/pectines.htm>(consulté le 17/05/21)
- (9) Popov, S. V., et Yu. S. Ovodov. « Polypotency of the Immunomodulatory Effect of Pectins ». *Biochemistry (Moscow)*, vol. 78, no 7, juillet 2013, p. 823 35. DOI.org (Crossref), doi:10.1134/S0006297913070134. (consulté le 18/05/21)
- (10) Develop. of a Procedure to Assess Pectins in RTBs:Relationship Between Pectin Types & CassavaCooking. www.youtube.com, https://www.youtube.com/watch?v=_egp-4qjkHY. (consulté le 20/5/21)
- (11) « The Reaction of Carbazole with Carbohydrates: I. Effect of Borate and Sulfamate on the Carbazole Color of Sugars ». *Analytical Biochemistry*, vol. 19, no 1, avril 1967, p. 119 32. www.sciencedirect.com, doi:10.1016/0003-2697(67)90141-8. (consulté le 20 /05/21)
- (12) Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars ». *Analytical Biochemistry*, vol. 197, no 1, août 1991, p. 157 62. www.sciencedirect.com, doi:10.1016/0003-2697(91)90372-Z. (consulté le 23/5/21)
- (13) Jarvis, M. C., et al. « Intercellular Adhesion and Cell Separation in Plants: Intercellular Adhesion and Cell Separation in Plants ». *Plant, Cell & Environment*, vol. 26, no 7, juillet 2003, p. 977 89. DOI.org (Crossref), doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01034.x. (consulté le 23/5/21)
- (14) Kintner P, 1982. Carbohydrate Interference and Its Correction in Pectin Analysis Using the MHDP Method. *J Food Science* (47):757-760) (consulté le 23/5/21)

Liste des illustrations

<u>Figure 1</u> : Logo UMR QUALISUD	1
<u>Figure 2</u> : Schéma d'une cellule végétale	3
<u>Figure 3</u> : Molécule d'acide galacturonique	3
<u>Figure 4</u> : Polymère d'acide galacturonique avec monomères méthylés en vert.....	3
<u>Figure 5</u> : Modèle de la boîte à œuf	3
<u>Figure 6</u> : Histogramme représentant les teneurs en acide galacturonique dans différentes conditions dans des variétés de manioc	4
<u>Figure 7</u> : Réaction de déshydratation en milieu acide	5
<u>Figure 8</u> : Molécule de 3-phényl-phénol.....	5
<u>Figure 9</u> : Réaction de la β -élimination.....	6
<u>Figure 10</u> : Analyseur de flux continu	8
<u>Figure 11</u> : Schéma du principe du flux continu	8
<u>Figure 12</u> : Schéma d'une bobine de mélange	9
<u>Figure 13</u> : photo de la pompe péristaltique	9
<u>Figure 14</u> : Schéma du principe de la pompe péristaltique	9
<u>Figure 15</u> : Représentation schématique de l'analyseur de flux continu	9
<u>Figure 16</u> : courbes de gamme d'étalonnage d'acide galacturonique avec réactifs neufs vs anciens.....	14
<u>Figure 17</u> : courbes représentant la moyenne de teneur en acide galacturonique des répétitions 1 et 2 en fonction de la moyenne de teneur en acide galacturonique des répétitions 3 et 4	15

<u>Tableau 1</u> : résultats obtenus en 2020 sur six variétés de manioc avec 100 mg de farine (moyenne de 2 résultats).....	4
---	---

<u>Tableau 2</u> : Préparation de la gamme d'étalonnage d'acide galacturonique.....	8
---	---

<u>Tableau 3</u> : résultats teneur en acide galacturonique obtenus à pH 10 + EDTA 0,05 M et à pH 10 avec deux ratios d'extraction en avril 2021 (moyenne de 2 résultats).....	11
<u>Tableau 4</u> : Résultats des teneurs en pectines avant et après congélation des extraits	11
<u>Tableau 5</u> : Résultats de teneur en pectines sur des standards d'acide galacturonique	12
<u>Tableau 6</u> : Résultats de la répétabilité de l'automate	13
<u>Tableau 7</u> : Résultats de la reproductibilité de la méthode	13
<u>Tableau 8</u> : Résultats obtenus à pH 10 + EDTA 0,05M sur des variétés de manioc	14
<u>Tableau 9</u> : Résultats obtenus à pH 10 sur des variétés de manioc.....	15
<u>Tableau 10</u> : résultats de teneurs en pectines sur des mêmes variétés de manioc obtenues en 2020 et en 2021	16
<u>Tableau 11</u> : Résultats de teneurs en pectines obtenus sur six variétés de manioc contrastées	18

Résumé

Ce stage de fin d'études au sein de l'UMR QUALISUD s'inscrit dans le projet RTB foods visant l'adoption de racines, tubercules, et bananes à cuire dans cinq pays d'Afrique. Les pectines sont suspectées de jouer un rôle majeur dans le comportement en cuisson de ces aliments. La présence en grande quantité de pectines non méthylées est suspectée de rendre la cuisson des aliments lente et difficile. L'objectif du stage était de développer et valider une méthode de dosage automatisée des pectines dans des variétés de RTB. Les résultats obtenus ont permis de valider les conditions expérimentales et de démontrer la grande fiabilité de cette méthode. Cependant, au terme de ces huit semaines, l'hypothèse n'a pu être validée. La recherche n'est pas assez avancée pour valider ou infirmer le lien existant entre pectines non méthylées et la cuisson des tubercules.

Mots-clés : Pectines, cuisson, manioc, acide galacturonique, dosage

Abstract

This end-of-study internship at UMR QUALISUD is part of the RTB foods project aimed at the adoption of cooking roots, tubers and bananas in five African countries. Pectins are suspected of playing a major role in the cooking behaviour of these foods, and the presence of large quantities of unmethylated pectins is suspected of making the cooking of foods slow and difficult. The objective of the internship was to develop and validate an automated method for the determination of pectins in RTB varieties. The results obtained validated the experimental conditions and demonstrated the high reliability of this method. However, at the end of the eight weeks, the hypothesis could not be validated. The research is not sufficiently advanced to validate or invalidate the link between unmethylated pectins and tuber cooking.

Keywords : pectins, cooking, cassava, galacturonic acid, assay