



université
PARIS-SACLAY

UNIVERSITÉ
PARIS
SUD
Comprendre le monde,
construire l'avenir!

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DES PLANTES ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

CentraleSupélec



Master Génie des Procédés et Bioprocédés M2 Parcours Procédés, Biotechnologies, Aliments

MÉMOIRE

Pour l'obtention du
Master en Génie des Procédés et Bioprocédés de l'Université Paris-Saclay
Parcours Procédés, Biotechnologies, Aliments

Présenté par : **ABOUNIDA Khadija**

Sur le thème :

**Identification des paramètres physico-chimiques qui affectent la texture
d'une purée de tomate lorsqu'on change de procédé.**

Réalisé à :

Institut National de la Recherche Agronomique INRA PACA
Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (UMR408 SQPOV)
228 route de l'Aérodrome Domaine Saint Paul site Agro-parc
CS 40509 – Avignon Cedex

Maître de stage : **PAGE David**

Enseignant(e)-tuteur de stage : **BEAL Catherine**

Stage effectué du : **(05/03/2018)** au **(31/08/2018)**

Soutenu le : **(28/08/2018)**

Rapport confidentiel : Date d'expiration de confidentialité : **(jj/mm/aaaa)**

Attestation de non-plagiat

Je soussigné(e) : **ABOUNIDA Khadija**

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat sans citation ni référence, d'un document ou d'une partie de document, sous quelque forme que ce soit (ouvrage, article, autre rapport, internet), constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je déclare que ce rapport est le fruit d'un travail personnel réalisé dans le cadre du stage de master et m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour produire et écrire ce rapport.

Signature : ABOUNIDA Khadija



Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de différentes façons à la réussite de mon stage et plus particulièrement :

Mr. David Page de m'avoir accordé sa confiance, pour ses précieux conseils et ses efforts permanents dans le but d'assurer le bon déroulement de ce stage, et pour son immense gentillesse et sa disponibilité.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude et mes profonds remerciements à Mr. Frédéric Carlin de m'avoir accueilli au sein de l'unité SQPOV.

Je tiens à remercier ma tutrice de stage, Mme Catherine Beal pour son aide, son suivi et sa visite dans les locaux de l'INRA. Je vous témoigne ma plus profonde gratitude et mon grand respect.

J'adresse un grand merci à Mr. Francois Puel pour ses conseils et les orientations qu'il n'a cessé de nous apporter toute l'année.

Mes remerciements s'adressent également à tous les professeurs membres du jury d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examineur

Un remerciement particulier à Mr. Alexandre Leca et Line Touloumet pour leur aide précieuse, et leur appui technique lors de diverses manipulations.

Je tiens à remercier spécialement Mr Romain Bott, Mme. Sylvie Bureau et Mme Carine Le-Bourvellec. Et aussi à tous les membres permanents et non permanents avec qui j'ai eu la chance de travailler et d'interagir au cours de mon stage. Pour leurs conseils, leur complémentarité, leur gentillesse et leur disponibilité.

Un grand merci à ma mère, mes sœurs et ma famille d'avoir toujours cru en moi. Je vous aime profondément.

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	8
<i>Lieu de stage</i> :	8
<i>Contexte</i> :	8
<i>Etudes bibliographique</i>	10
I. La purée de fruits	10
1) Définition.....	10
2) Les éléments constitutifs de la purée	10
a) Les particules.....	10
b) Le sérum	10
3) Modification de la texture des purées	11
a) Rôle de la concentration et du rapport sérum/particules	11
b) Rôle de la taille et de la forme des particules.....	12
c) Le sérum et sa viscosité	13
II. Procédé de fabrication	14
1) Les étapes de fabrication d'une purée de tomate	14
a) Lavage.....	14
b) Broyage et raffinage.....	14
c) Extraction	14
d) Désaération et concentration	14
e) Pasteurisation / Stérilisation	14
2) Procédés Hot break ou Cold break	15
a) Procédé de « Cold break ».....	15
b) Procédé de « Hot break ».....	15
3) Influence du tamisage sur la viscosité	15
<i>Matériels et Méthodes</i>	16
1) Matériel végétal : deux variétés de tomate contrastées et 2 conduites de culture	16
2) Mesure de l'activité enzymatique des fruits (PG et PME)	17
3) Transformation des tomates	18
4) Mesure de la viscosité des purées de tomate.....	18
5) Caractéristiques physico-chimiques des purées	18
a) Indice réfractométrique (Brix)	18

b) Matière sèche totale	19
c) Teneur en matière sèche structurale ou MIA	19
d) pH et L'Acidité Titrable	19
6) Etude structurale des purées	19
a) Granulométrie.....	20
b) Microscope optique et macroscope.....	21
c) Analyse d'image	21
7) La viscosité du sérum	21
8) Approche statistique PLS-DA : recherche de corrélation entre variables et viscosité	21
<i>Résultat</i>	22
1) Activité enzymatique PME et PG	22
2) Viscosité des purées expérimentales	22
3) Variations des caractéristiques biochimiques des purées	23
Les valeurs obtenues des différentes variables biochimiques : Annexe C	23
4) La distribution massique du poids sec en différents classes de taille des particules :	23
a) Observation des petites particules au microscope	25
b) Mesure des grosses particules par analyse macroscopique	26
5) Evolution de la viscosité du sérum	28
6) Identification par analyse PLS-DA des variables impliquées dans les effets variétaux et cuisson :	28
a) Relation entre les variables mesurée et la viscosité de manière générale :	29
b) Relation entre la viscosité due aux variétés et les variables mesurées :	29
c) Identification des facteurs et paramètres qui contribuent aux effets du procédé : .	29
<i>Discussion</i>	30
1) Evolution de la viscosité en fonction de la variété et/ou du procédé.....	30
2) Impact du procédé/variétés sur les autres variables caractéristique (Brix, pH...).....	31
3) Identification des facteurs et paramètres qui contribuent aux effets génotypes	31
4) Identification des facteurs et paramètres qui contribuent aux effets procédés	32
<i>Conclusion et perspectives</i> :	32
<i>Résumé</i>	33
<i>Abstract</i>	33
<i>Références</i>	34

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'approximation de milieu continu selon Coussot (2005)	10
Figure 2. Domaines de concentration des suspensions de particules végétales selon (Bayod, 2008). De gauche à droite : dilué, semi-dilué et concentré.....	12
Figure 3. Effet de la forme des particules sur la viscosité relative de la suspension (Barnes, 2000).....	12
Figure 4. Changement de la viscosité de sérum pendant la concentration de jus de tomate (Diaz et al., 2009).....	13
Figure 5. Effet du traitement mécanique sur la morphologie des particules végétales en suspensions (Redgwell et al., 2008).....	16
Figure 6. Le mobile de mesure en hélice hélicoïdale.....	18
Figure 7. Interaction de la lumière avec une particule (Boualem, n.d.).....	20
Figure 8. Activité enzymatique PME et PG dans les deux variétés de tomate utilisées.....	22
Figure 9. La viscosité de différents échantillons de purée utilisées.....	22
Figure 10. Effet marquant de cuisson sur les variables pH et MIA.....	23
Figure 11. Distribution des tailles de particules obtenues sur le tamis à 80µm (diffraction laser).....	24
Figure 12. Distribution des tailles de particules traversant tamis à 80µm (diffraction laser)	25
Figure 13. Observation microscopique (10x) des petites particules de la variété Terradou (A) et H1311 (C).....	26
Figure 14. L'observation des grosses particules au microscope.....	27
Figure 15. Distribution de la surface des particules de deux variétés (imageJ).....	28
Figure 16. La viscosité de sérum des purées étudiées.....	28
Figure 17. Projection des échantillons selon les deux premières composantes de la PLS-DA discriminant les variétés.....	29
Figure 18. Projection des échantillons selon les deux premières composantes de la PLS-DA discriminant le procédé.....	30

Liste des tableaux

Tableau 1. Résultats obtenus par le tamisage	25
Tableau 2. Résultat du calcul VIP.....	30

Liste des abréviations

HB	Hot break
CB	Cold break
MIA	Matière Insoluble à l'Alcool
MS	Matière sèche
IR	Indice de réfraction
AT	Acidité Titrable
PG	Polygalacturonase
PME	Pectine Methyl Estérase
PP	Quantité de petite particule
GP	Quantité de grosse particule
DiamPP	Diamètre de petite particule
DiamGP	Diamètre de Grosse particule
Viscsérum	Viscosité de sérum

Introduction générale

Lieu de stage :

Mon stage qui a duré 6 mois (du 05 Mars 2018 au 31 Aout 2018) a été effectué dans le centre Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) de l'institut National de la Recherche Agronomique (INRA) en Avignon, au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV).

Le centre INRA PACA est un centre de recherche tourné vers l'agroécologie des systèmes de culture sous serres et en vergers et la modélisation de l'impact régionalisé du changement climatique à l'échelle du paysage. Il se situe entre autre sur le domaine Saint Paul, Avignon, France. L'unité qui m'a accueillie l'UMR SQPOV, a pour objectif de concevoir, dans une optique d'alimentation durable, les procédés de transformation pour les fruits et légumes afin de préserver leurs qualités nutritionnelles par des traitements calculés au plus juste, tout en respectant leur sécurité microbiologique et en valorisant toute la biomasse utilisée.

Contexte :

Le sujet de mon stage portait sur la qualité organoleptique des produits à base de tomate. Ils sont obtenus par transformation industrielle des tomates dites « d'industrie ». Ces dernières, sont cultivées en plein champ, non tuteurées et ramassées à la machine entre les mois d'Août et Septembre.

La tomate est un aliment consommé partout dans le monde. Comme on la retrouve dans beaucoup de produit manufacturés sous forme de sauce ou de préparation avec morceaux, elle fait l'objet de nombreux échanges commerciaux. La production de tomate en France est estimée à 625 000 tonnes par an¹. Les tomates sont consommées en frais, mais 60% de la production mondiale est transformée en produits manufacturés et principalement (environ 80%) sous forme de concentrés (ou « pâte de tomate ») (Source SONITO 2016). La pâte de tomate est utilisée comme ingrédient principal pour d'autres produits tels que le ketchup, les sauces, mais on la retrouve aussi sous forme de spécialités telles que les jus, 'passatas' (tomate concassée) et purées.

Les principaux paramètres de qualité pour l'acceptation de ces produits par le consommateur sont la couleur, la saveur ainsi que la texture.

En industrie, la transformation des tomates nécessite une série d'opérations unitaires : à leur arrivée l'usine, elles sont lavées, broyées, puis subissent un premier traitement thermique appelé le « break » pour stabiliser les réactions enzymatiques. Puis la purée est raffinée à travers des tamis rotatifs (pour enlever les pépins et les résidus de cuticules), et la purée est placée dans un concentrateur pour obtenir des produits peu concentrés jusqu'à la pâte de tomate concentrée 3 fois. Puis les produits sont stabilisés thermiquement et conditionnés. Le break est une étape importante qui détermine une bonne partie de la texture finale du produit. On distingue deux types : le « cold break » (CB) où les tomates sont broyées à une température n'excédant pas 70°C et le « hot break » (HB) où les tomates sont chauffées au-

dessus de 95°C immédiatement après le broyage pour inhiber toute forme de réaction enzymatique des fruits. Les principaux enzymes visés sont les enzymes pectinolytiques contenus dans les fruits et qui contribuent à liquéfier le produit. La texture de la purée est une propriété organoleptique. Elle dépend directement des propriétés mécaniques des aliments, elles-mêmes fonction de la structure de la purée.

Pour les industriels, la connaissance des propriétés structurelles des produits qui déterminent la texture, devient donc nécessaire pour créer des aliments avec des propriétés de texture maîtrisées.

Pour mieux comprendre les facteurs impliqués dans la texture, deux variétés de tomate, Terradou et H1311 ont été sélectionnées car elles sont connues pour fournir des purées contrastées. Nous avons donc deux origines pour le contraste de texture : la variété ou le procédé (hot ou cold break).

L'objectif de mon stage a donc été de comprendre les facteurs induits par l'un ou l'autre. Pour répondre à cet objectif, nous avons choisi un ensemble de méthodes pour chercher et mesurer des paramètres physicochimiques connus pour influencer la viscosité, et faire une étude structurale des purées en utilisant des techniques physique (comme le tamisage humide, la granulométrie) ou biochimique. Enfin, nous avons vérifié si les paramètres qui varient sont les mêmes pour des modifications de textures induites par la variété ou par le procédé.

Etudes bibliographique

I. La purée de fruits

1) Définition

Une purée de fruits est définie comme une suspension concentrée où les particules insolubles (pulpe) sont dispersées dans une phase aqueuse continue « sérum ». Ces particules sont des fragments de cellules, des clusters de cellules (groupe de cellules encore joints), ou des résidus de parois végétales. Lors de la transformation de fruits en purée, ces parois perdent leur fonction de turgescence et forment des cellules ou des amas de cellules plus ou moins hydratées ou poreuses. Leur contenu est en équilibre avec la phase continue dispersante : le sérum. Cette dernière est constituée du contenu cellulaire dispersé (Lopez-Sanchez et al., 2012).

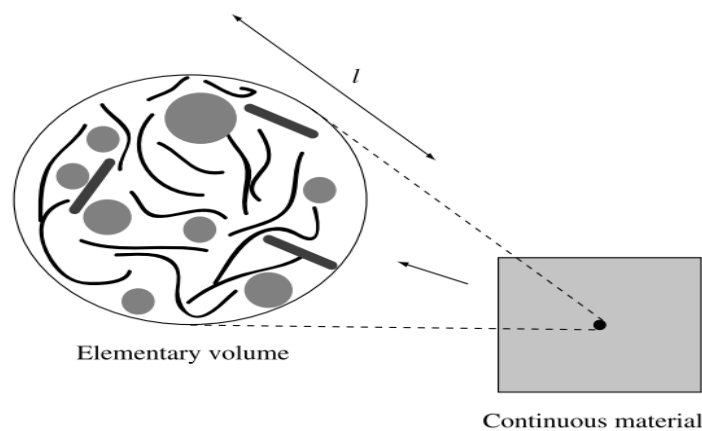


Figure 1. Représentation schématique de l'approximation de milieu continu selon Coussot (2005).

2) Les éléments constitutifs de la purée

a) Les particules

Les principaux constituants biochimiques des particules insolubles sont la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. S'ajoutent, dans le cas d'une purée de tomate (ou autres fruits riches en caroténoïdes), des petits granules hydrophobes contenant les caroténoïdes et des granules de protéine (Lopez-Sanchez et al., 2012; Mohr, 1987). Les résidus de cellules proviennent de différents types de tissus. Les cellules parenchymateuses sont de forme ronde, alors que les tissus vasculaires contiennent des cellules plates et de plus faible taille. Ces différents types cellulaires et la distribution en taille des particules seraient affectés par la structure de la paroi, la diversité des substances pectiques, et le degré de maturité des fruits (Ouden and Vliet, 1997).

b) Le sérum

Le sérum est une phase aqueuse continue essentiellement constituée de matières solubles (telles que les polymères pectiques, les sucres simples, les sels minéraux et les acides organiques), et le contenu des cellules fortement endommagées par le procédé de fabrication (Diaz et al., 2009).

Les étapes de cuisson et de raffinage entraînent des changements dans la composition des parois végétales, une dégradation des polymères de la paroi qui libèrent des monomères ou des polymères de petites tailles qui deviennent à leurs tours solubles, ce qui aboutit à la formation des différents composés de sérum. Ils affectent alors sa viscosité (Diaz et al., 2009; Mohr, 1987).

La composition chimique du sérum va dépendre de la variété et de la maturité du fruit ainsi que du procédé de fabrication (Diaz et al., 2009).

3) Modification de la texture des purées

a) Rôle de la concentration et du rapport sérum/particules

La concentration en particules est un paramètre qui détermine le type de suspension (diluée, semi-diluée ou concentrée) ainsi que la microstructure. La concentration en particules est exprimée de différentes façons : soit en se basant sur la teneur en éléments insolubles soit en calculant la fraction volumique (Bayod, 2008).

- Les éléments insolubles : exprimés par rapport à la quantité en matière sèche de parois. La technique la plus utilisée est celle du « Water insoluble solide » (WIS). Quantification directe par pesée après lavage de la teneur en solides à l'eau. Une autre technique est la détermination du « Matériel Insoluble à l'Alcool » (MIA). Le MIA contient toutes les pectines, y compris celles qui sont solubles dans l'eau. (Espinosa.L 2012)
- la fraction volumique occupée par les particules, qui est le rapport du volume occupé par les particules sur le volume total considéré : (Servais et al., 2002)

$$\Phi = \frac{V_{Particule}}{V_{Totale}} = \frac{V_{Particule}}{V_{Particule} + V_{liquide}} \quad (\text{eq.1})$$

Suivant leur concentration, les suspensions peuvent être classées en trois domaines présentant des propriétés rhéologiques différentes (Bayod, 2008; Lopez-Sanchez et al., 2012)

- **Une suspension diluée :** C'est un régime où les particules ne remplissent pas tout l'espace, elles sont gonflées à leur taille d'équilibre, elles sont libres de se déplacer et de s'écouler. Le système n'a pas de module élastique et ni de limite d'élasticité. Ce comportement a été observé pour les dispersions avec une fraction volumique inférieure à 0,0043 pour la carotte, 0,027 pour le brocoli et 0,0027 pour la tomate.
- **Une suspension semi-diluée :** correspond à la formation d'un réseau percolé entre les particules. Les particules ne sont pas libres de se déplacer ni de s'écouler. Elles sont en interactions directes au repos. Le système a un seuil d'écoulement et la viscosité de suspension augmente. Ce comportement a été observé pour des fractions volumiques inférieure à 0,016 pour la carotte, 0,043 pour le brocoli et 0,0050 pour la tomate.
- **Une suspension concentrée :** correspond à un fort encombrement du système, les particules remplissent tout l'espace disponible et sont obligées de se déformer et de diminuer le volume pour s'accommoder à l'espace disponible permettant ainsi l'écoulement.

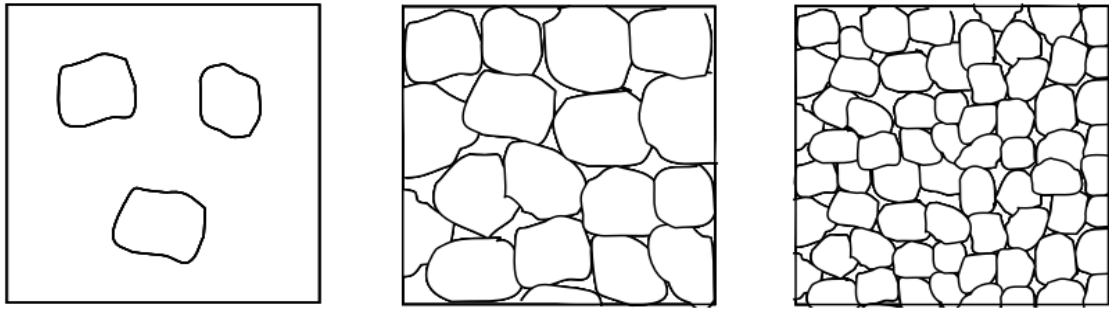


Figure 2. Domaines de concentration des suspensions de particules végétales selon (Bayod, 2008). De gauche à droite : dilué, semi-dilué et concentré

b) Rôle de la taille et la forme des particules

La taille de particule est l'un des paramètres qui influence la viscosité des suspensions végétales. Cependant les études qui lient la taille des particules à la viscosité des purées sont souvent contradictoires, selon la matière première caractérisée (espèce végétale), le degré de maturité du végétal, et les conditions de traitements thermiques ou mécaniques. Ces derniers influencent la taille et la forme des particules (Lopez-Sanchez et al., 2011).

Pour le cas des tomates concentrées, certains auteurs (Tanglertpaibul and Rao, 1987) ont montré que la distribution de la taille de particules intermédiaires et larges (0,686mm et 1,143mm) augmente la viscosité apparente et la limite élastique. L'amélioration de la surface d'échange entre particules et un compactage efficace de ces dernières pour créer un réseau plus cohésif sont les hypothèses de fonctionnement du système. Cependant (Yoo and Rao, 1994) montrent que la viscosité est accrue lorsque la taille de particules est réduite. Et ils ont expliqué cela en raison de la distance d'interaction plus courte entre les petites particules (Lopez-Sanchez et al., 2011).

Le changement de viscosité de la purée ne dépend pas seulement de la taille, mais aussi de la forme, la quantité et la déformabilité des particules et des interactions entre particules.

L'effet de la forme a été étudié par (Barnes, 2000): l'ajout de particules sous forme de tige, de fibres ou de particules non sphériques est plus efficaces pour augmenter la viscosité que l'ajout de particules sphérique (figure 3).

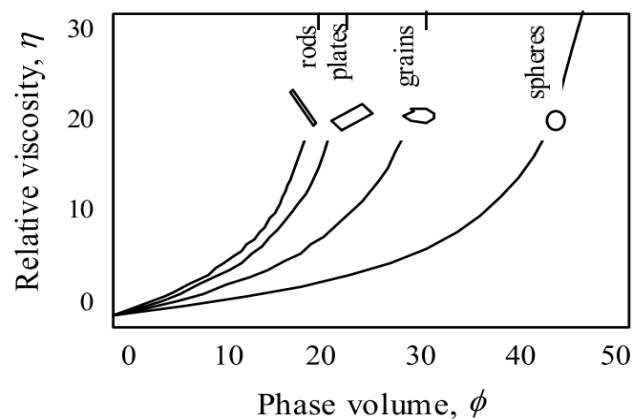


Figure 3. Effet de la forme des particules sur la viscosité relative de la suspension (Barnes, 2000).

Dans le même sens [Cassandra Leverrier \(2016\)](#) montre que la forme et la taille des particules influent sur la viscosité des suspensions dans les domaines intermédiaires et concentrés. Les purées contenant des amas de cellules (grosses particules de formes irrégulières) présentent des viscosités plus fortes que celles observées pour des suspensions ne contenant que des cellules individuelles (particules de plus petites tailles, ayant des formes plus régulières.)

c) Le sérum et sa viscosité

Le sérum est la phase liquide continue qui composée d'eau et de matières solubles (principalement des polymères pectiques, et des sucres) qui lui confèrent sa viscosité. Les pectines présentes dans le sérum sont utilisées comme des indicateurs des changements survenus dans la paroi cellulaire, car pendant le traitement thermique la pectine est solubilisée à partir de la pulpe vers le sérum([Diaz et al., 2009](#)).

Le sérum joue un rôle majeur dans les modifications de texture. Il est principalement influencé par les pectines. Lorsqu'on applique une homogénéisation à haute pression à des purées de faible consistance, il y a une augmentation des poids moléculaires des pectines, ce qui sous-entend la création d'interaction entre des pectines dissoutes. Il y a également une augmentation de la viscosité. Les interactions entre pectines sont donc une des bases des modifications de texture de purées de tomate([Santiago et al., 2017](#)).

L'effet n'est pas le même pour le concentré. La viscosité du sérum diminue pendant les phases de fabrication, et en particulier aux étapes où la température de traitement atteint 90°/95°C, bien qu'il ait une augmentation de la concentration de pectines dans le sérum. La conservation de la structure des pectines a donc un rôle sur la viscosité, tout autant que la quantité solubilisée([Diaz et al., 2009](#)).

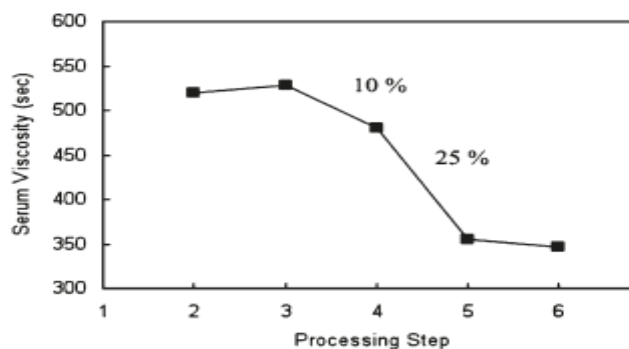


Figure 4. Changement de la viscosité de sérum pendant la concentration de jus de tomate([Diaz et al., 2009](#))

Bien que la viscosité du sérum contribue à la viscosité apparente de la purée, elle n'a pas un effet de premier ordre sur celle-ci, son rôle reste mineur par rapport à celui de la teneur en pulpe. Ainsi la viscosité réelle (η réel) peut s'exprimer en suivant l'équation suivante :([Cantú-Lozano et al., 2000](#); [Tanglertpaibul and Rao, 1987](#)).

$$\eta \text{ réel} = \frac{\eta \text{ suspension}}{\eta \text{ phase continue}} \quad (\text{eq.2})$$

II. Procédé de fabrication

1) Les étapes de fabrication d'une purée de tomate

Les produits à base de tomate sont produits à partir des tomates tournantes à mures. A l'entrée de l'usine, sur un échantillon témoin de la benne (environ 20 kg), les tomates sont classées en fonction de leur maturité, du pourcentage de défauts (pourritures, présence de nécroses), et de la propreté (présence de corps étranger, principalement des cailloux). Le 'Brix' (taux de sucre soluble) est mesuré systématiquement pour calculer le prix d'achat par l'usine. Lorsque le lot est conforme, les purées sont fabriquées par les étapes suivantes :

a) Lavage

C'est une opération qui permet d'éliminer principalement les particules de terre ainsi qu'une partie des micro-organismes et moisissures de contamination. Après lavage, les tomates passent par un ultime tri visuel. (Élimination des derniers corps étrangers tels que les tiges ou les cailloux). Les opérations de tri sont réalisées de plus en plus souvent au moyen des trieurs optiques, mais reste en grande partie manuel dans de nombreuses usines (Gould, 1992).

b) Broyage et raffinage

Les tomates triées passent dans un broyeur à marteau à une température de l'ordre de 70°C pour l'obtention d'un mélange de jus, pépins et épiderme, qui est ensuite envoyé directement vers l'étape de raffinage pour l'extraction à froid (Cold Break), ou vers une installation de préchauffage suivie de l'extraction à chaud (Hot Break). (Gould, 1992).

c) Extraction

Les tomates sont ensuite passées à travers un extracteur (ou raffineur) pour enlever la peau et les graines. Il consiste en un tamis circulaire dont les mailles varient entre 0,7mm à 4mm. L'extraction de la purée peut être effectuée avec un extracteur à vis ou à palette. Pour les deux, la purée est poussée à travers le tamis. Cette étape affecte la taille des particules. (Gould, 1992).

d) Désaération et concentration

Elle consiste à éliminer l'air dissous en introduisant la purée dans une enceinte sous vide. Le produit est alors chauffé à 40° environ. Couplé au vide, cette température permet d'évaporer progressivement l'eau de la purée pour augmenter la viscosité et réduire la séparation du sérum. Ce processus permet d'obtenir des purées entre 7 et 24% de solides solubles (ou 'Brix'). (Gould, 1992).

e) Pasteurisation / Stérilisation

L'objectif de ce traitement thermique est de porter le produit à une température 90-95°C pour détruire tous les germes pathogènes et d'éliminer la population microbienne. La stérilisation s'effectue après le remplissage si le produit est conditionné en petit contenant (boite, bouteille) dans des autoclaves contenant de l'eau chaude à 90-95 °C, pendant un temps de séjour d'environ 20 minutes, ou le plus souvent pour la pâte de tomate, le produit est directement transféré stérilement dans des poches stériles dont la taille varie de 5kg à 250kg pour les stockages en fut. Ce dernier traitement permet d'assurer une conservation de longue durée à température ambiante. (Gould, 1992).

2) Procédés Hot break ou Cold break

Ce sont les étapes clés pour déterminer la texture de la purée. Le procédé est appliqué sur les tomates broyées en fonction du produit final désiré.

a) Procédé de « Cold break »

Les tomates sont broyées et raffinées à une température de 60-70 °C. Cette température est insuffisante pour inactiver complètement les enzymes pectinolytiques tel que la polygalacturonase (PG) et la pectine-méthyl estérase (PME) (Gould, 1992).

La PME est une enzyme endogène à la plupart des fruits et des légumes. Elle agit sur le squelette de pectine qui est contenue dans la paroi cellulaire végétale. Son action consiste à enlever le groupement méthyl présent sur les acides galacturoniques. Elle libère du méthanol, des protons. En diminuant le degré de méthylation (DM), la pectine devient susceptible de subir une dégradation supplémentaire par PG. La PME est inactivée complètement par un traitement thermique à 88°C pendant 20s. (Hsu, 2008; Van Buggenhout et al., 2009).

La PG est liée aux parois cellulaires. Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons α -(1-4)-glycosidique des pectiques, Cette enzyme n'agit que sur des segments déméthylés de la chaîne de pectine elle provoque sa dépolymérisation et donc un changement de texture des purées. L'inactivation complète de cet enzyme est obtenue par un traitement à 93°C pendant 3 min. (Hsu, 2008; Sila et al., 2009)

b) Procédé de « Hot break »

Ici, à l'inverse la pulpe est chauffée immédiatement après le broyage à une température autour de 90-95°C, ce qui provoque une inactivation des enzymes et ainsi conserver les propriétés texturants des pectines. Les purées HB sont naturellement plus visqueuses (Gould, 1992).

3) Influence du tamisage sur la viscosité

Le tamisage est une autre étape clé qui affecte la texture en modifiant la taille, la distribution et ainsi que la morphologie des particules. L'effet du tamisage dépend du tissu et de l'espèce végétale (Lopez-Sanchez et al., 2011; Tanglertpaibul and Rao, 1987). Selon les conditions du tamisage, les amas cellulaires et les cellules sont plus ou moins cassées. Un tamisage plus puissant produit une texture plus lisse et homogène.

(Redgwell et al., 2008) Ont comparé l'effet de traitement mécanique (cisaillement) sur les suspensions de cellule de 3 fruits : pomme, kiwi et tomate. Sur le kiwi il a pour effet de séparer les amas de cellules en amas plus petits, en cellules individuelles et en fragments de cellules. Pour la pomme le traitement a un effet plus léger car la plupart des cellules gardent leur intégrité. Par contre pour la tomate, le traitement engendre une destruction totale des cellules, dispersant dans le milieu des fragments de cellules et des particules de taille colloïdale.

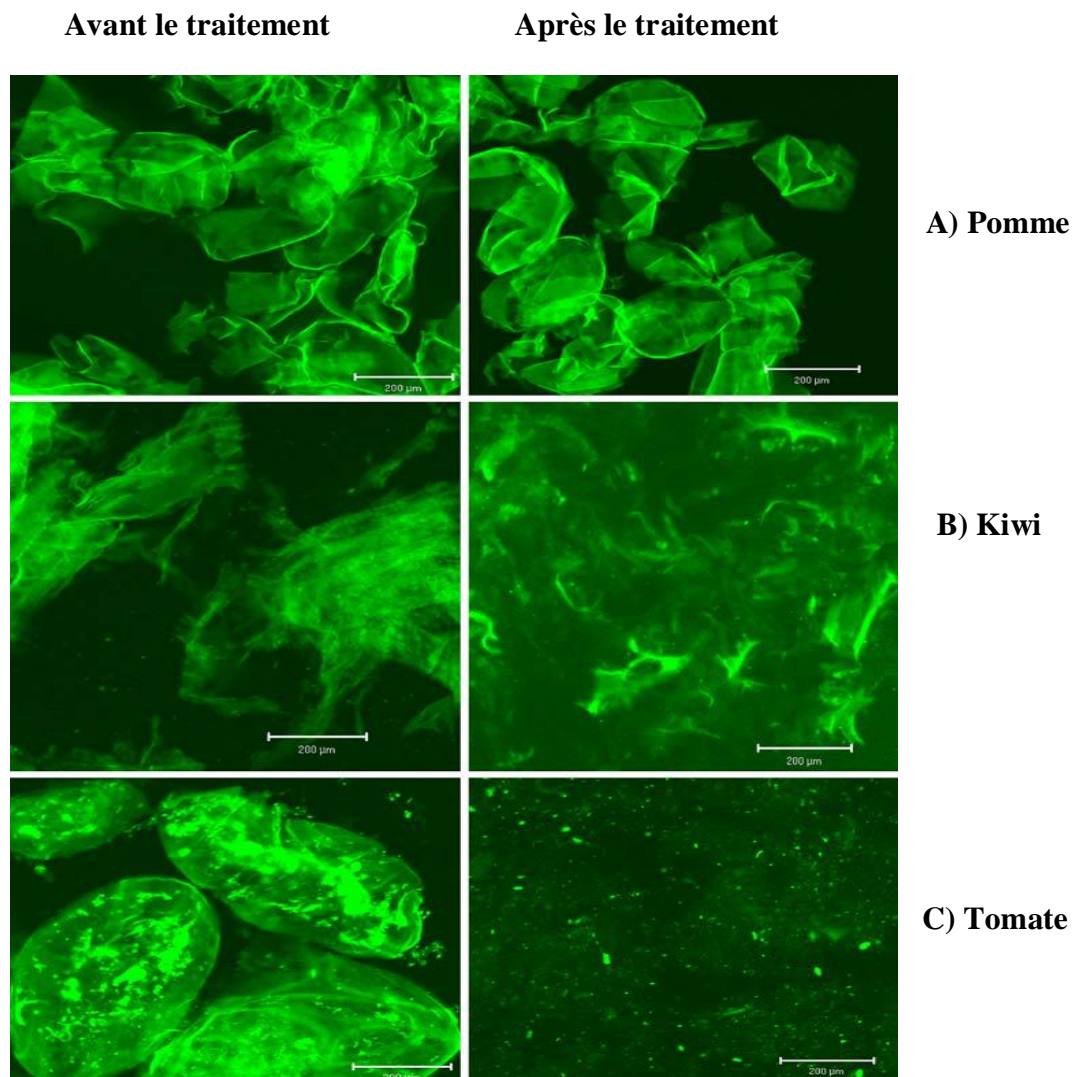


Figure 5. Effet du traitement mécanique sur la morphologie des particules végétales en suspensions (Redgwell et al., 2008)

Dans le cas de jus de tomate la viscosité de jus est affectée par le diamètre des mailles des tamis.

(Tanglertpaibul and Rao, 1987) Ont comparé la viscosité de deux purées de tomate qui ont été obtenue à partir de deux tamis, qui diffèrent par le diamètre de leurs pores.

Un tamis avec des mailles à 0,020 mm donne une purée ou concentré de tomate constituée essentiellement de petite particules avec peu de grosses particules, ce qui engendre une faible viscosité. Un tamis de 0,027mm permet de laisser passer des particules de plus grosses tailles et donne à la fin une purée de forte viscosité.

Matériels et Méthodes

1) Matériel végétal : deux variétés de tomate contrastées et 2 conduites de culture

Deux variétés de tomate ont été utilisées, TERRADOU et H1311, qui sont connues pour fournir des purées à contrastées pour leur texture, lesquelles ont été conduites avec deux niveaux d'irrigation : témoin (100% de remplacement de l'évapotranspiration des plantes) ou sous déficit hydrique (remplacement de seulement 50% de l'évapotranspiration).

2) Mesure de l'activité enzymatique des fruits (PG et PME)

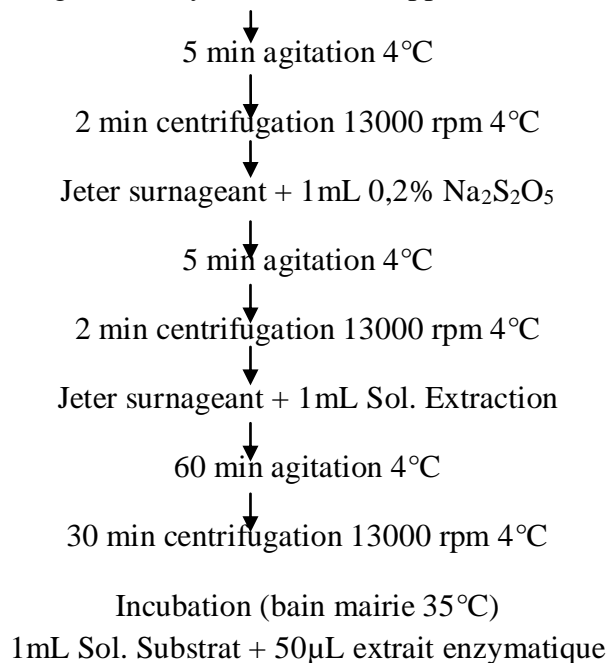
Un lot représentatif de chaque variété (environ 20 fruits) a été lavés, puis une tranche centrale de chaque fruit a été immédiatement congelée à l'azote liquide, broyé à l'aide d'un broyeur à couteau et les poudres obtenues ont été conservées à -80°C . Les mêmes poudres ont été utilisées pour mesurer l'activité polygalacturonase (PG) et pectine methyl esterase (PME).

Dosage de l'activité PG :

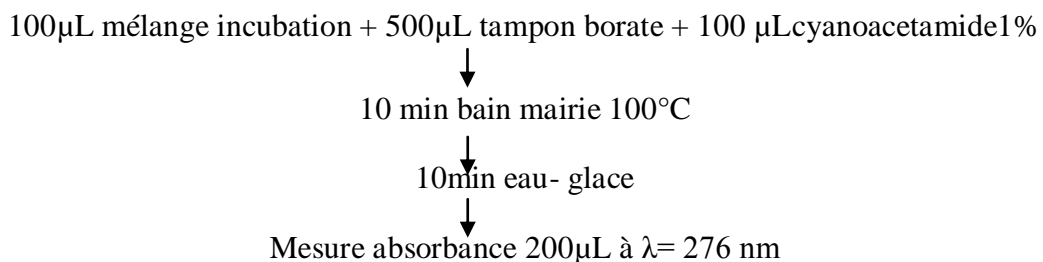
Cette coloration permet de doser l'apparition des acides galacturoniques libérés par action de la PG sur une pectine commerciale déméthylée utilisée comme substrat standard.

Schéma récapitulatif de l'expérimentation

Extraction 0,50g Fruit broyé dans le tube Eppendorf + 1 mL 0,2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$



Dosage



Gamme d'étalonnage : ANNEXE A

Dosage de l'activité PME :

Le dosage s'effectue en neutralisant les fonctions acides d'une chaîne pectique commerciale qui sont libérées lors de leur deméthylation par l'extrait enzymatique.

Schéma récapitulatif de l'expérimentation :

0,50g d'échantillon dans un eppendorf +1mL de solution d'extraction
2h agitation à 4°C
↓
30 min centrifugation 13000 rpm 4°C
↓
Transférer des aliquotes d'au moins 300µl d'extrait dans les nouveaux tubes eppendorf,
congeler avec l'azote et conserver à -80°C.

Préparation des solutions ANNEXE A

3) Transformation des tomates

Les purées de tomate utilisées dans cette étude ont été fournies par le CTCPA (Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Avignon, France), et ont été fabriquées par 2 procédés, CB et HB. Pour HB la température de traitement thermique était à 95°C et pour CB à une température de 40°C pendant 10 min. Puis les purées de HB et CB ont été stabilisées à 95°C pendant 5min. le raffinage a été effectué dans un tamis de 0,8mm.

4) Mesure de la viscosité des purées de tomate

La viscosité est mesurée à l'aide d'un rhéomètre MCR301 (Anton Paar, Germany) équipé d'un dispositif en hélice hélicoïdale. Il est utilisé pour la purée de tomate à la place du dispositif à cylindres coaxiaux utilisés traditionnellement pour la purée de pomme (Espinosa 2012) Et cette mesure est effectuée à une température de 22,5°C.



Figure 6. Le mobile de mesure en hélice hélicoïdale

L'échantillon est placé dans une chambre cylindrique dans laquelle est introduit le mobile tournant. La mesure est effectuée à un gradient de cisaillement constant de $3s^{-1}$.

5) Caractéristiques physico-chimiques des purées

a) Indice réfractométrique (Brix)

Le principe de mesure est basé sur la réfraction de la lumière créée par les éléments solubles du liquide qu'elle traverse, principalement sucres et acides organiques dans une moindre mesure. La réfraction est proportionnelle à leur concentration. Cette mesure est effectuée à une température ambiante. L'indice de réfraction est directement converti en équivalent

saccharose dans le milieu. La valeur lue s'exprime en degré brix (g de saccharose par 100 g de solution). Environ 1 g de purée est placé sur la vitre du réfractomètre (ATAGO). La valeur est affichée directement sur l'appareil.

b) Matière sèche totale

La mesure consiste à mettre 3g de la purée de tomate dans une coupelle. Et puis de les déshydrater dans l'étuve à une température de 70°C pendant 3 jours. Le pourcentage de la matière sèche est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{Matière sèche} = \frac{\text{poids après l'étuve}}{\text{Poids initial}} \times 100 \quad (\text{eq.3})$$

c) Teneur en matière sèche structurale ou MIA

La matière insoluble à l'alcool (MIA) représente le pourcentage massique de poudre végétale après élimination des molécules solubles en milieu hydro-alcoolique et de l'amidon. Elle est principalement constituée des pectines, celluloses et hémicelluloses. Environ 1g de poudre de purée de tomate lyophilisée est pesé, puis ajouté à 10ml d'hexane (pour éliminer les caroténoïdes). Le mélange, est placé sous agitation (1minute), puis l'hexane est éliminé par centrifugation (pendant 5min à 9000rpm). Le culot est placé dans l'éthanol 96°, agité et porté à ébullition pendant 30 min. Le culot est alors transféré sur un dispositif de filtration muni d'une pompe à vide, puis rincé l'alcool à 70% jusqu'à disparition des sucres solubles. Ces derniers sont détectés dans l'effluent de rinçage par un test au phénol. Les échantillons sont enfin, repris deux fois dans un mélange acétone : eau et acide acétique (80%) puis avec de l'acétone pure jusqu'à décoloration du surnageant. Puis la poudre obtenue est séchée dans une étuve à 40°C pendant 2 jours.

$$\% \text{ paroi Cellulaire} = \frac{W_{\text{matériel insoluble sec}}}{W_{\text{purée initiale}}} \quad (\text{eq.4})$$

d) pH et L'Acidité Titrable

Le pH est mesuré par immersion directe de la sonde de pH-mètre dans la purée. La mesure est s'effectuée 3 fois.

L'acidité titrable a pour le but de déterminer le pouvoir tampon de la purée dû à la présence d'acides organiques du fruit tels que les acides acétiques, citriques, et malique. Le dosage est effectué par titration avec une base forte (NaOH 0,1N), jusqu'à neutralisation de l'acidité du fruit à un pH de 8,1. L'acidité titrable est s'exprimée en meq/100g.

6) Etude structurale des purées

Schéma général de protocole : ANNEXE B

Mesure de la fraction volumique : Les purées de tomate ont été centrifugées pour séparer le sérum de culot : condition de centrifugation (300g de chaque échantillon (15min, 9000rpm)).

Séparation massique des constituants de la purée en différentes classes de particules : tamisage à travers un tamis vibrant dont les mailles ont un diamètre de 80µm. Le transfert est aidé en ajoutant de l'eau (environ 1 L). Le refus du tamis (qui contient les particules >80µm de diamètre) est pesé, ainsi que son contenu en matière sèche. Les particules <80µm en

suspension dans l'eau de lavage sont précipitées par centrifugation (15min à 5000rpm) Le culot est récupéré, pesé y compris pour son poids sec et considéré comme la fraction de particules <80µm. Le poids sec due surnageant est déduit par différence avec les autres poids secs relativement au poids sec déposé sur le tamis. Il contient essentiellement les éléments solubles dans l'eau et une faible part de très petites particules qui ne précipitent pas.

a) Granulométrie

Pour caractériser la distribution de taille des particules qu'elles contiennent, chaque fraction est mesurée par granulométrie laser qui permet d'estimer la taille des particules dispersée dans un liquide par diffraction de la lumière. La technique de granulométrie laser, s'appuie sur deux théories : la théorie de Mie, décrivant les phénomènes de diffusion et la théorie de Fraunhofer dans le cas particulier de la diffraction de la lumière.

Lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau laser de lumière incidente, cette lumière peut être déviée ou absorbée en fonction de sa longueur d'onde et des propriétés optiques des particules. La déviation de la lumière est décrite par les phénomènes de la réflexion, la réfraction et la diffraction (voir figure 7).

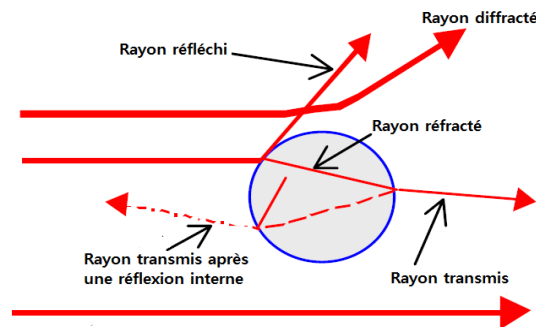


Figure 7. Interaction de la lumière avec une particule (Boualem, n.d.)

Une petite quantité de purée, ou des fractions isolées sont déposées dans l'eau distillée, utilisée comme dispersant, puis pompé à travers l'appareil (MasterSiZe Malvern Instrument, Ltd, UK). La vitesse de la pompe est réglée à 2030 rpm La sensibilité de l'appareil permet de détecter des particules ayant des tailles de 0,1µm -2000µm. Chaque échantillon est mesuré 3 fois.

En raison de la forme irrégulière des particules, le résultat de la mesure est exprimé par le diamètre qu'aurait la sphère théorique de la particule. Une telle sphère est appelée sphère équivalente. Des algorithmes de traitement d'image convertissent le signal en informations granulométriques, distribution en taille et nombre ou volume de particules correspondant à chaque taille. (Espinosa 2012) La taille des particules est généralement exprimée en diamètre sphérique équivalent et peut être calculée en fonction du volume ($d_{4,3}$) ou de la surface occupée par les particules ($d_{3,2}$).

$$d_{43} = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad (\text{eq 5})$$

$$d_{32} = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad (\text{eq 6})$$

Où n_i est le pourcentage de particules de diamètre d_i .

b) Microscope optique et macroscopie

La taille réelle des particules a été également mesurées par microscopie optique pour les particules $<80\mu\text{m}$. L'observation est directe (sans coloration) après une dilution de la préparation suffisante pour que les particules ne soient pas agglomérées. La préparation est montée entre lame et lamelle est observée à travers un objectif x10, en utilisant un filtre de polarisation de la lumière incidente qui augmente le contraste entre les particules et le fond. Les préparations sont prises en photo et la taille des particules de 15 champs optique est analysée par analyse d'image.

Pour les particules $>80\mu\text{m}$, la tailles de celles-ci est mesurée par macroscopie. L'observation est s'effectuée sous UV (à 365nm) et dans une solution de Calcofluor.

La préparation de 50ml de la solution mère de Calcofluor à 1% : On pèse 0,5g de Calcofluor dans un bécher de 100ml et on complétera avec 50 ml d'eau distillée et la mettre sur l'agitateur magnétique chauffant. Après la dissolution complète du Calcofluor on ajoute de l'hydroxyde de sodium 1M jusqu'à avoir un pH de la solution de Calcofluor à 1% à compris entre 10-11.

La préparation de 0,25ml de l'échantillon dans une boite de pétri en ajoutant de 6ml de Calcofluor (diluée au centième) et la placer sous l'objectif x10, proche de la lampe UV.

c) Analyse d'image

Les images numérisées sont analysées par le logiciel ImageJ. Cette méthode permet la mesure la taille des particules en commençant d'abord de définir une échelle qui permet de convertir les pixels de l'image en en μm . Puis, l'image est convertie images en binaire (blanc pour les objets et noir pour le fond en déterminant un seuil manuel qui est ajusté à un niveau tel que le contour de chaque particule soit bien clair. Puis on fait une analyse particule qui permet de calculer et mesurer la taille des particules présentés sur l'image ensuite on fait une distribution pour avoir le nombre des particules en fonction de la surface de celles-ci.

7) La viscosité du sérum

Le sérum a été récupéré à partir de la centrifugation initiale de la purée. Sa viscosité est mesurée par le même rhéomètre que celui utilisé pour la purée, mais avec une géométrie à double entrefer. Ce dispositif permet de doubler les surfaces de frottement et est donc adaptés aux produits qui ont une viscosité faible. La courbe d'écoulement est réalisée entre 10 et 1000 s⁻¹ (progression logarithmique en 8 min).

8) Approche statistique PLS-DA : recherche de corrélation entre variables et viscosité

Au cours de cette étude plusieurs variables ont été mesurées et l'on cherche à relier leur variation aux changements de viscosités. On cherche donc, une combinaison de variables qui permet de créer un modèle permettant d'expliquer la variation de viscosité. D'abord on applique PLS (Partial Least Squares) entre les variables mesurées et les viscosités pour savoir s'il existe un modèle général à travers lequel on peut déterminer les variables qui affectent la viscosité. Ensuite on réalise PLS-DA (discriminante Analysis) dont le but de savoir si certaines des données observées sont plus particulièrement impliquées pour discriminer les échantillons issus de différentes variétés ou procédés. Ceci se fera en calculant des VIP, les

variables importantes en projection, qui sont une classification de l'importance de chaque variable pour le modèle.

Résultat

1) Activité enzymatique PME et PG

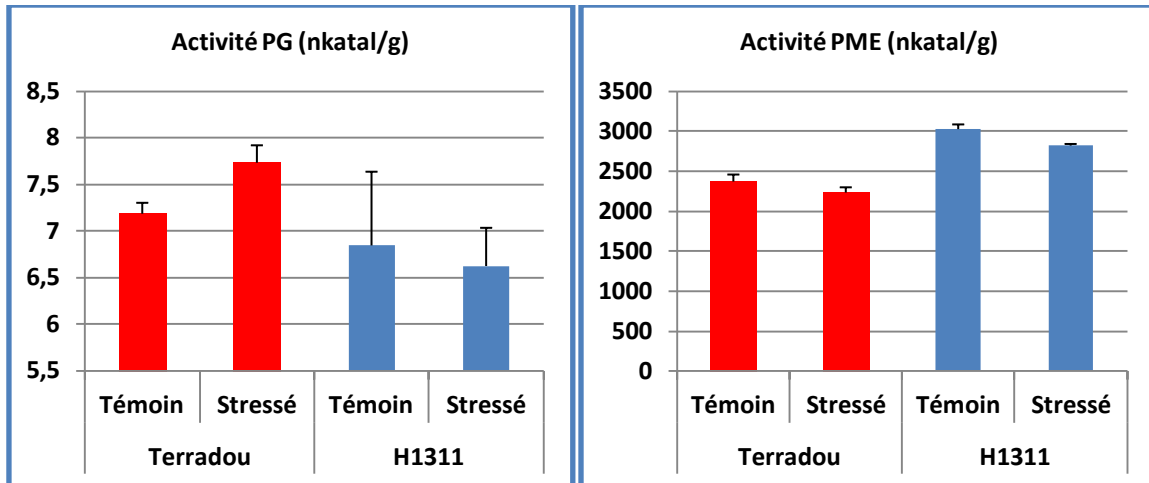


Figure 8. Activité enzymatique PME et PG dans les deux variétés de tomate utilisées.
Rouge : Terradou et Bleu : H1311

Pour les deux variétés, l'activité enzymatique est dominée par la PME. Elle est 400 fois plus active que la PG. Par contre, les deux lignées présentent des profils opposés : La variété H1311 affiche une plus forte activité PME que Terradou, de 600 nkatal/g, mais en revanche Terradou affiche une plus forte activité PG 0,7 nkatal/g.

Pour pouvoir comparer, nous avons également mesuré l'activité de ces deux enzymes pour la pomme. L'activité PG mesurée était de 0,18 nkatal/g, soit environ 40 fois plus faible que la tomate, et de 35 nkatal/g l'activité PME, soit environ 70 fois plus faible de la tomate.

2) Viscosité des purées expérimentales

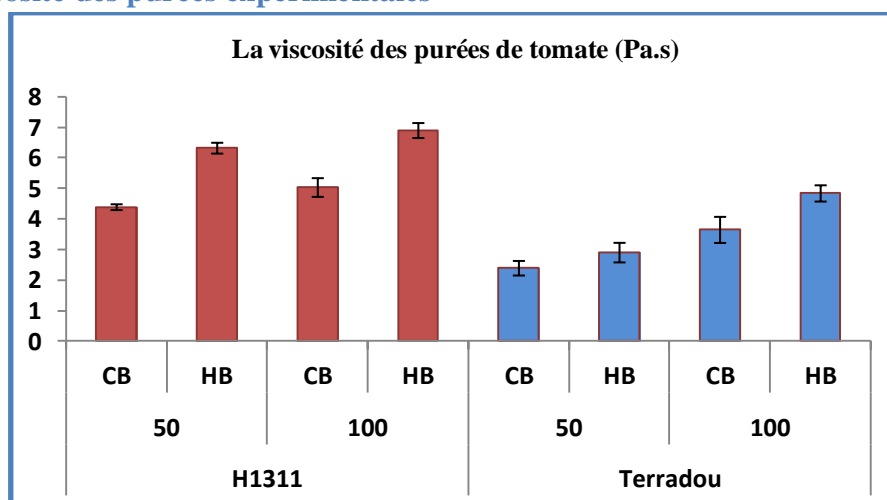


Figure 9. La viscosité de différents échantillons de purée utilisés
Rouge : H1311 et Bleu : Terradou

Comme attendus, les purées sont contrastées pour leur texture : les valeurs varient de 2.4 Pa.s à 6.9 Pa.s. L'ANOVA indique que la variété, le niveau d'irrigation et le traitement ont tous des effets hautement significatifs ($p < 10^{-8}$). Comme attendu, les viscosités pour la variété H1311 sont plus fortes 5.65 Pa.s.

La viscosité des purées stressées hydriques est moins forte pour les deux variétés. Terradou est la variété plus sensible au stress hydrique pour une même purée, les écarts sont plus grands. Et enfin l'effet cuisson : comme prévu, HB est plus visqueux. Par contre l'écart entre HB et CB est plus fort pour H1311 (environ 2 points au lieu de 0.5 à 1 point pour Terradou).

3) Variations des caractéristiques biochimiques des purées

Les valeurs obtenues des différentes variables biochimiques : **Annexe C**

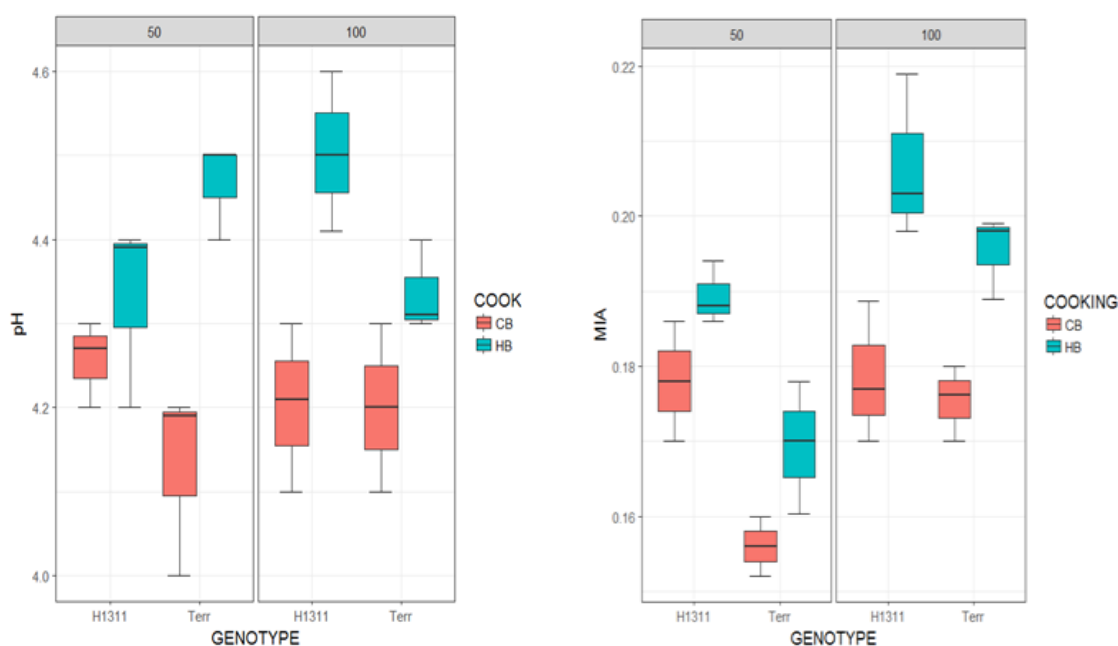


Figure 10. Effet marquant de cuisson sur les variables pH et MIA

Les variables biochimiques ne présentent pas de variations majeures, toutes les valeurs étant dans les mêmes gammes. Pour % MS et IR le test ANOVA montre qu'il n'existe aucun effet significatif ($P > 0,52$ pour MS et $P > 0,1372$ pour IR) ni pour l'effet génotype ni pour l'effet cuisson sur ces deux variables, puisque toutes les purées sont initialement concentrées à 8 Brix. Par contre il y a un net effet du génotype sur le MIA (en moyenne 0,01%) et l'AT (en moyenne de $1,9 \cdot 10^{-6}$ %), mais des interactions avec le stress hydrique. Il apparaît un effet significatif du mode de cuisson : CB fait chuter le MIA et le pH. Ce qui semble logique vu la réaction enzymatique.

4) La distribution massique du poids sec en différents classes de taille des particules :

La purée a été séparée en 4 fractions constituantes : le sérum (séparé par centrifugation), les petites et les grosses particules (séparées à l'aide d'un tamis à 80 μ m) et les matières solubles (obtenues par différences).

Tableau 1. Résultats obtenus par le tamisage :

Variété	Traitement	Cuisson	sérum (%)	petites particules (%)	grosses particules (%)	solubles (%)
Terradou	100	CB	65,63	4,61	13,86	15,90
	50	CB	65,51	3,57	8,00	22,92
	100	HB	58,87	4,34	16,59	20,20
	50	HB	63,55	5,14	13,53	17,77
H1311	100	CB	60,89	5,13	18,49	15,50
	50	CB	58,56	7,82	16,84	16,78
	100	HB	55,46	4,73	21,51	18,30
	50	HB	53,80	5,33	20,48	20,40

Les résultats montrent qu'il existe des différences de répartition en masse dans chacune de ces catégories en fonction du génotype et du mode de cuisson. H1311 a tendance à fournir moins de sérum et plus de grosses particules que la variété Terradou. Les variations sont moins franches pour les petites particules et les matières solubles.

Taille des particules : La taille des particules obtenues par tamisage humide a été mesurée par diffraction laser (mesure indirecte) et par observation optique (mesure directe) : microscopie pour les particules <80µm et microscope (loupe) pour les autres).

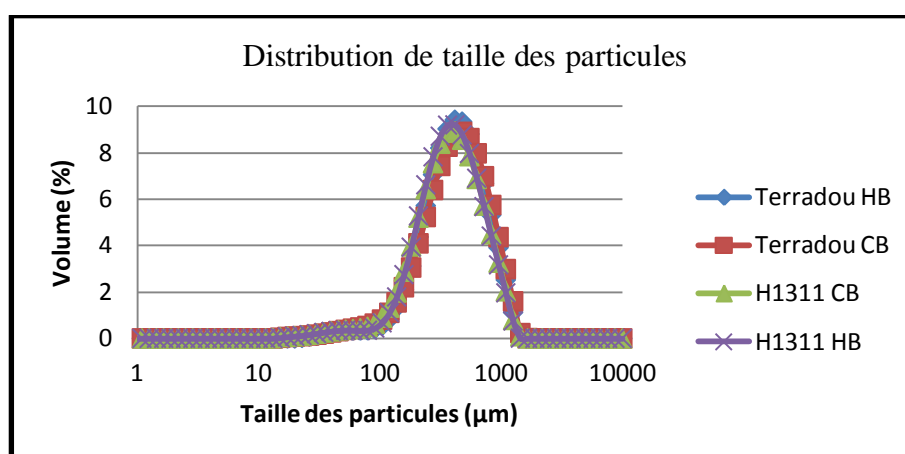


Figure 11. Distribution des tailles de particules obtenues sur le tamis à 80µm (diffraction laser)

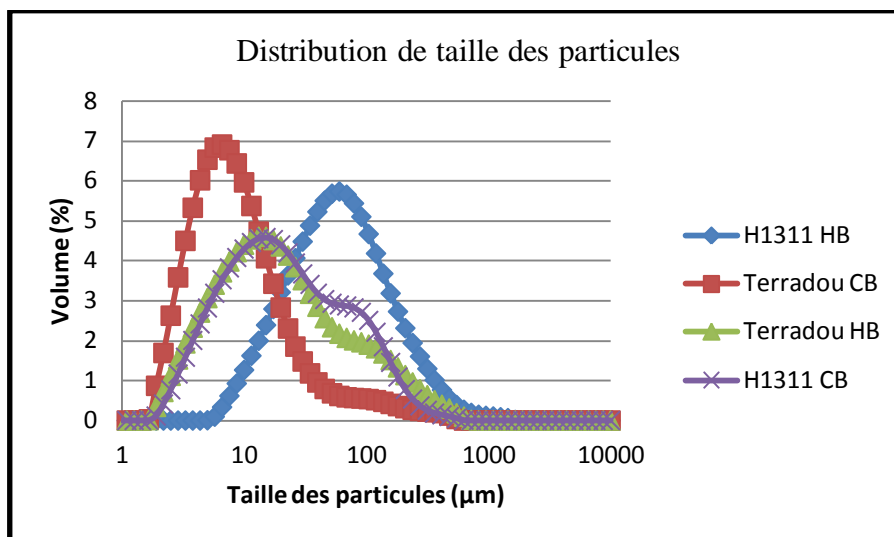


Figure 12. Distribution des tailles de particules traversant tamis à 80µm (diffraction laser)

La distribution des grosses particules, est monomodale et homogène quelles que soient la variété ou le traitement. La courbe s'étend de 100µm à 1200µm, avec une valeur moyenne de 600µm. Par contre la répartition des particules <80µm est plus variable, montrant des courbes monomodales ou bimodales, et des moyennes différentes en fonction du traitement et de la variété, sans pour autant laisser apparaître de tendance claire. Terradou CB montre des particules plus petites que toutes les autres, mais H1311 CB et Terradou HB montre des particules de taille similaires.

A noter que les résultats obtenus par diffraction laser, montrent des tailles de particule plus grande que le diamètre des pores de tamis (80µm), à travers lequel elles sont passées. Ceci peut s'expliquer soit par la déformabilité de cette classe des particules, (qui leur permet de traverser les mailles en suivant le mouvement de l'eau de rinçage), soit par leur ré-agglomération après le tamisage lorsqu'elles sont en solution. Pour tenter de mieux interpréter les résultats, les particules ont également été observées par observation optique directe (micro ou macroscopie).

a) Observation des petites particules au microscope

L'observation montre que l'opération de tamisage a bien éliminé les fibres et les résidus de cellules entières, puisque nous n'observons que des particules semblant correspondre à des amas de contenus cellulaires. On obtient bien des amas des tailles variables. Le comptage et la mesure des particules par analyses d'image montrent la même tendance que les résultats du tamisage. Les purées CB ont un plus grand nombre de particules plus petites (figure 13). Ce résultat n'est en revanche pas corrélé avec les observations par diffraction laser.

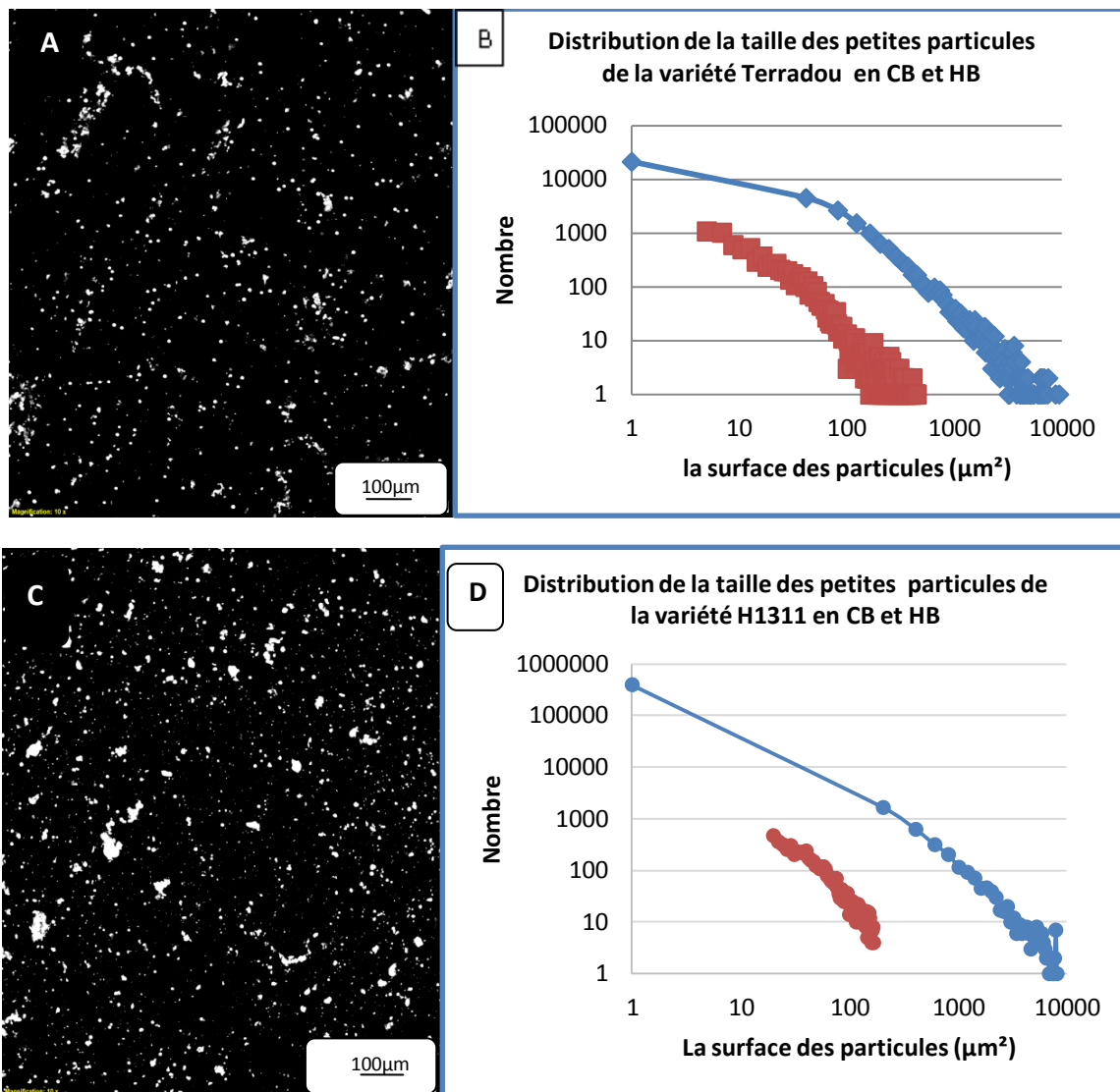


Figure 13. Observation microscopique (10x) des petites particules de la variété Terradou (A) et H1311 (C). Et la distribution de la surface des particules (B,D). Bleu : CB et Rouge : HB

b) Mesure des grosses particules par analyse macroscopique

H1311

Terradou

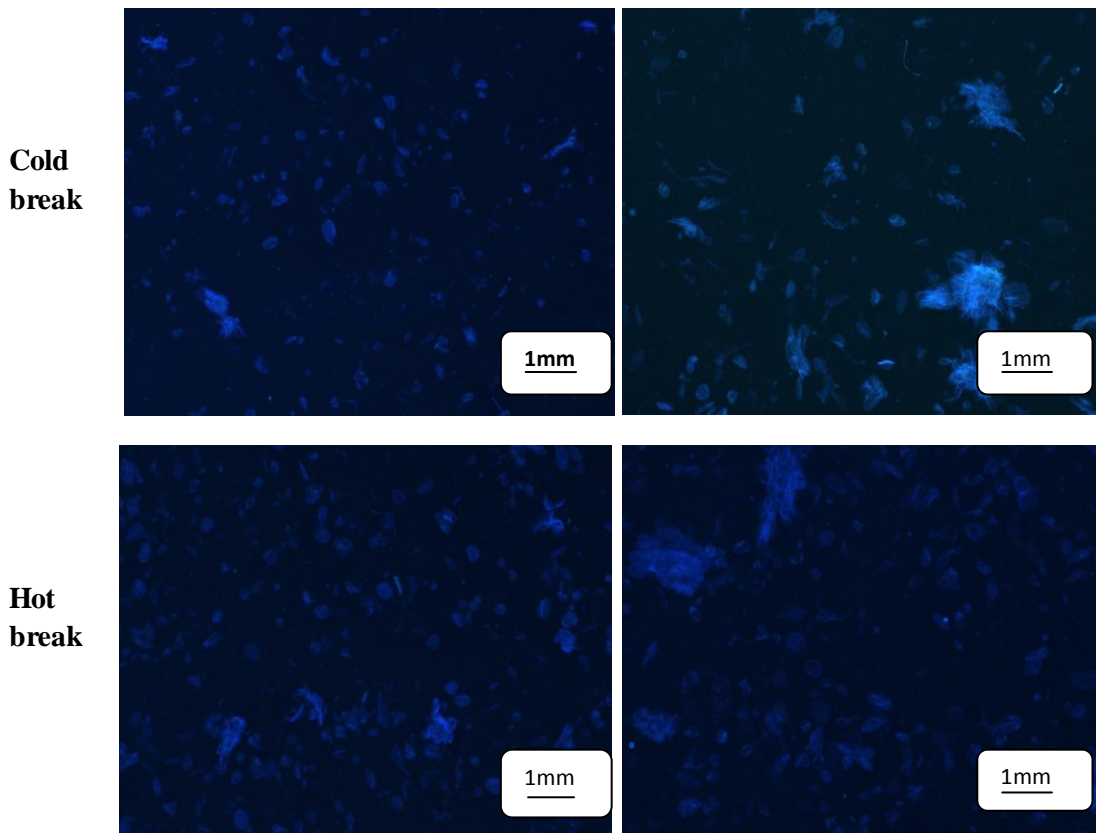


Figure 14. L'observation des grosses particules au microscope

Les images macroscopiques (après coloration des parois) montrent que cette fraction contient principalement des cellules uniques, des morceaux de parois cellulaires, ainsi des agglomérations cellulaires. La majorité des cellules ne sont pas sphériques et ont une forme allongée. Il n'y a cependant pas de différences clairement visibles entre des préparations issues de procédé HB/CB ou entre les deux variétés. Il faut donc utiliser le comptage et la mesure des particules par l'analyse d'image pour montrer des différences de distributions des tailles.

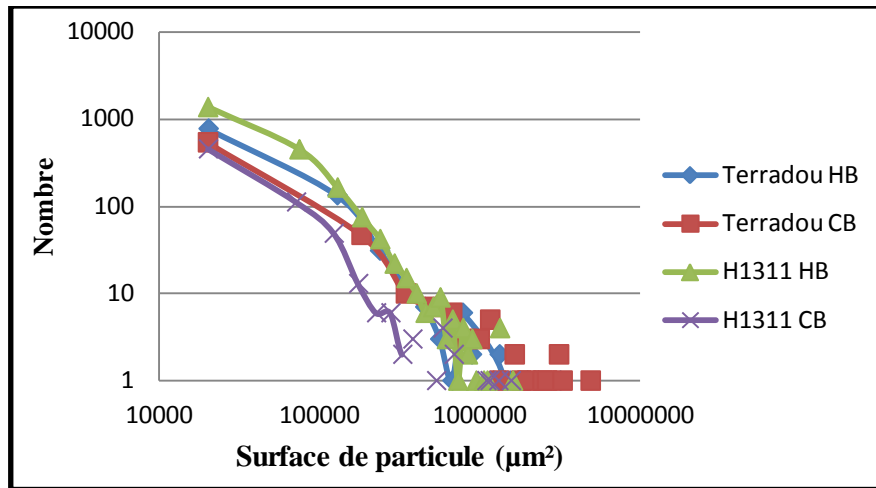


Figure 15. Distribution de la surface des particules de deux variétés (imageJ)

Les purées HB possèdent toujours un plus grand nombre de grosses particules que les purées CB et les purées de H1311 contiennent toujours plus de particules grande taille que les purées de Terradou.

5) Evolution de la viscosité du sérum

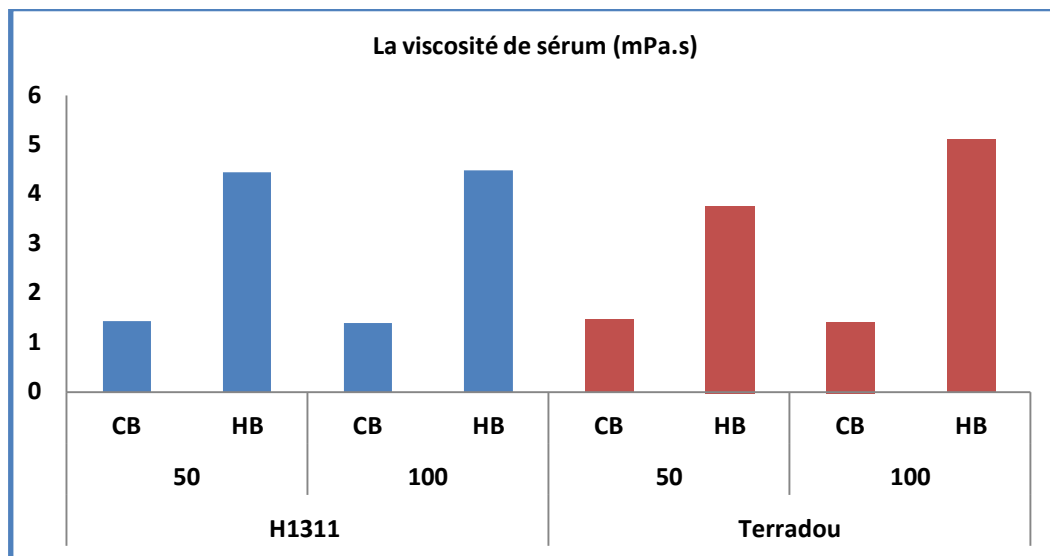


Figure 16. La viscosité de sérum des purées étudiées
Rouge : Terradou et Bleu : H1311

La viscosité des sérums est nettement affectée par le procédé : celle des sérums HB varient de 3,75 à 5,11 alors que celle des sérums CB varient de 1,39 à 1,46. En revanche, la viscosité des sérums est peu influencée par la variété ou le stress hydrique.

6) Identification par analyse PLS-DA des variables impliquées dans les effets variétaux et cuisson :

L'analyse PLS puis PLS-DA permet de conclure pour savoir si les variables que nous avons mesurées varient conjointement avec la viscosité des échantillons, d'une part, et d'autre part si ce sont les mêmes variables qui sont impliquées dans les variations de viscosité dues à la variété ou dues au traitement HB/CB.

a) Relation entre les variables mesurée et la viscosité de manière générale :

Les résultats montrent tout d'abord une corrélation globale entre la viscosité et les paramètres mesurés. Le modèle proposé est significatif avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,786$ et un facteur qualitatif $Q^2 = 0,753$. Ce résultat confirme que les variables choisies ont une relation significative avec la texture des purées.

b) Relation entre la viscosité due aux variétés et les variables mesurées :

Un modèle significatif, calculé à partir des variables mesurées, permet de discriminer les échantillons issus des deux lignées. Les échantillons sont parfaitement discriminés (figure 17) : le modèle prédit parfaitement l'appartenance des échantillons à l'un des deux groupes. Le coefficient de corrélation (R^2) est de 0.91 et le facteur qualitatif Q^2 est de 0.81.

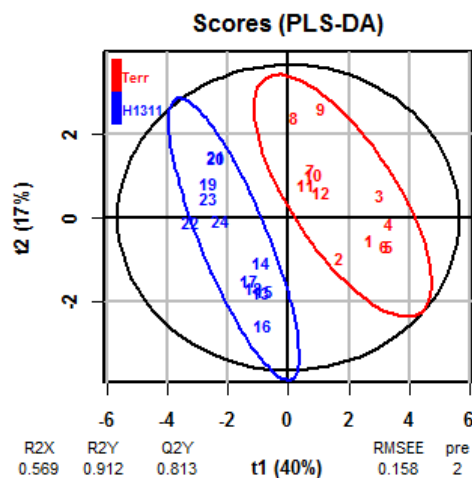


Figure 17. Projection des échantillons selon les deux premières composantes de la PLS-DA discriminant les variétés.

Le calcul des variables importantes en projection (VIPs) révèle que ce sont les proportions de particules/sérum et la taille des particules qui sont les plus prises en comptes pour ce modèle (voir tableau n°2).

c) Identification des facteurs et paramètres qui contribuent aux effets du procédé :

Comme pour la discrimination des génotypes, on peut calculer un modèle discriminant parfaitement les échantillons suivant leur mode de cuisson ($R^2 = 0.98$ et $Q^2 = 0.811$). Par contre, les VIP révèlent que ce sont d'autres variables qui sont impliquées, et en particulier la viscosité du sérum (la plus influente), le MIA et le pH, qui ont effectivement toutes les deux montrée un effet génotype hautement significatif.

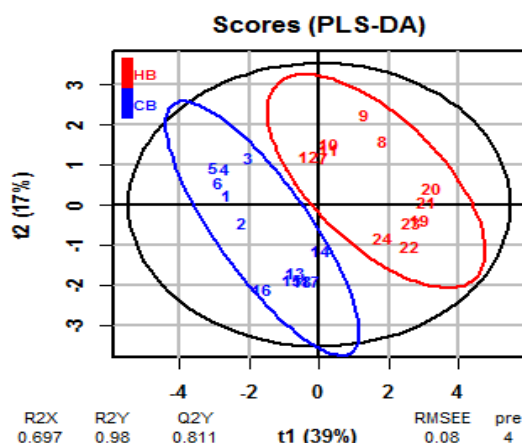


Figure 18. Projection des échantillons selon les deux premières composantes de la PLS-DA discriminant le procédé.

Tableau 2. Résultat du Calcul VIP

Variables	VIP	
	Variété	Procédé
Sérum	1.2002670	0,9967180
PP	0.7564627	0,6966835
GP	1.1895041	0,8545225
Solubles	0.4161363	0,5315970
DiamPP	1.3705148	0,8515683
DiamGP	1.5286339	0,7952872
Viscsérum	0.9565458	1,9036026
pH	0.7115644	1,3907004
IR	0.5430365	0,5741618
AT	1.2342785	0,9601121
MIA	0,8525194	1,1025324
MS	0.2777537	0,3548602

Discussion

1) Evolution de la viscosité en fonction de la variété et/ou du procédé

L'ANOVA appliquée aux résultats de viscosité montre que cette dernière est très significativement influencée par la variété ($P > 1,197 \cdot 10^{-12}$), mais également par le procédé ($P > 1,556 \cdot 10^{-9}$). L'interaction cuisson x variétés est également significative dans une moindre mesure, montrant que l'impact du procédé n'est pas tout à fait le même pour les deux variétés. Les viscosités des purées 'H1311' sont plus forte que celles de 'Terradou', quel que soit le procédé de fabrication. Ce résultat était attendu car les deux variétés sélectionnées n'ont pas le même intérêt, H1311 est une variété utilisée pour la fabrication du ketchup (donc a fort potentiel de viscosité). Par contre Terradou est une variété crée par INRA dans le but de fournir un haut brix. Les produits HB sont plus visqueux que les produits CB. Et ce résultat

est conforme à (Hsu 2008). Ce dernier a montré que la différence est attribuée à l'activité enzymatique de la PME et de la PG et la solubilisation des pectines que celles-ci entraîne. L'impact du traitement CB sur la perte de viscosité est plus important pour H1311 que pour Terradou. Le dosage de l'activité enzymatique des fruits montre qu'il n'y a pas de lien très direct entre l'activité enzymatique et les viscosités mesurées. La variété H1311 est caractérisée par l'existence de plus d'activité de PME et moins d'activité de PG. La perte de texture serait plus liée à PME. Mais il faut plus de points pour confirmer la relation.

2) Impact du procédé/variétés sur les autres variables caractéristique (Brix, pH...)

Le procédé a un effet très significatif sur les variables physico-chimiques pH ($p=0,00005822$), AT ($p=0,0001387$) et MIA de ($p=0,002741$). Une faible valeur de pH, et une plus faible teneur en MIA pour CB est cohérent avec la dégradation enzymatique de la pectine, qui serait responsable de la plus faible teneur en MIA des purées CB par rapport au HB. La dégradation des pectines par PG libère de l'acide galacturonique, et la déméthylation par PME libère une fonction acide. Ces deux réactions contribuent donc à d'acidifier le milieu. Il y a également un effet significatif de la variété sur l'acidité titrable (AT) ($p=0,000001953$), et le MIA ($p=0,011944$), montrant que ces deux variétés ont des activités métaboliques différentes.

Les purées H1311 qui ont une viscosité plus élevée, se distinguent des purées de Terradou par une plus grande quantité de grosses particules. Mais leurs tailles sont plus petites que celles de Terradou. Les données mesurées par granulométrie laser ne sont pas complètement cohérentes avec celles observées au microscope. Mais il n'est pas facile de dire laquelle est la plus juste. Le modèle de diffraction peut être influencé par les différences de structures des particules observées. Il n'y a pas de relation directe et absolue entre les observations de structure des purées et les variations de viscosité. D'où l'intérêt de passer par la PLS-DA.

3) Identification des facteurs et paramètres qui contribuent aux effets génotypes

Les facteurs les plus influents pour distinguer les échantillons issus de l'un ou l'autre de génotypes sont clairement des facteurs de structure : le diamètre de grosse particule > diamètre de petite particule > quantité de grosse particule présentée dans la purée > la quantité de sérum. Les purées 'H1311', qui ont une viscosité plus élevée se distingue des purées 'Terradou' par une plus forte proportion de grosses particules (20% au lieu de 12%). En revanche, paradoxalement, leurs grosses particules ont une taille plus petite de 300 à 400 μm contre 400-450 μm pour Terradou. Or la taille des particules est un élément déterminant pour la viscosité de la purée de pomme (Espinosa 2012). En tomate, la relation taille/viscosité n'est pas aussi claire. En effet, Tanglertpaibul et Rao (1987) ont étudié la relation entre la viscosité et la taille des particules pour des concentrés de tomate fabriqués en utilisant des tamis avec des ouvertures croissantes. Ils montrent également que la viscosité apparente est plus élevée pour des ouvertures plus grandes, qui donnent des particules de plus grandes tailles et en plus grand nombre. Par ailleurs, ils observent également que les plus petites ouvertures peuvent entraîner une augmentation des viscosités. Ils les attribuent à plus d'interactions de surface possible quand la taille des particules diminue, et à une meilleure capacité de compactage de ces dernières pour créer un réseau plus cohésif. Ce résultat est cohérent avec nos résultats de PLS-DA qui montre que, aussi bien le diamètre des grosses que celui des petites particules sont importants pour discriminer les échantillons entre variétés.

4) Identification des facteurs et paramètres qui contribuent aux effets procédés

Aussi bien les résultats d'ANOVA que ceux de la PLS-DA montrent que les paramètres essentiels qui discriminent les purées issues de procédé HB ou CB sont principalement la viscosité du sérum, le pH et l'AT. Ce résultat est cohérent avec le fait que le procédé de cold break permet aux enzymes PME et PG de dégrader les pectines. Cette action diminue la quantité de MIA, et contribue à réduire la viscosité de sérum. La baisse de pH est une conséquence de l'activité enzymatique. Ce résultat est en accord avec qui montrent qu'une augmentation de la solubilisation des pectines coïncide avec la diminution de la viscosité du sérum des concentrés de tomates.

Conclusion et perspectives :

L'objectif de mon travail était d'identifier des paramètres ou les facteurs qui affectent la texture d'une purée de tomate et de déterminer ceux qui sont liés au procédé de fabrication et ceux qui sont liés au génotype.

Pour atteindre notre but deux variétés de purée ont été sélectionnées ont été fabriqués de deux procédés différents. Et différentes techniques et appareils ont été mis en route (Rhéomètre, tamisage, microscope, macroscopie ...) et cette stratégie nous a permis de définir Trois paramètres clés qui ont l'impact sur la texture de purée de tomate :

- ✓ La taille des particules
- ✓ La quantité de particules
- ✓ La viscosité de sérum

Les 2 facteurs : la taille et la quantité des particules sont liés au effet de génotype par contre la viscosité de sérum au effet de procédé.

Les perspectives :

- ✓ Etude détaillée des caractéristiques de la paroi cellulaire
- ✓ Utilisation des tamis avec des pores de diamètres différentes et comparé les comportements des purées obtenus à partir de chaque tamis.

Résumé

Cette étude a pour le but de déterminer les paramètres qui ont un impact sur la viscosité de purée de tomate. Dans ce but, 8 échantillons ont été fabriqués à partir de deux variétés de tomate Terradou et H1311 et par deux traitements thermiques différents (hot break et cold break). La purée est une suspension de particule dispersée dans une phase aqueuse (sérum). Les résultats expérimentaux obtenus montrent que pour un traitement thermique de température (60-70°C) (Cold break) les enzymes PME et PG dégradent la pectine de la paroi cellulaire de tomate ce qui contribue à la fabrication d'une purée de tomate moins visqueuse. Le traitement hot break ne permet pas l'activité enzymatique et donc donne un produit plus visqueux. Et cela a été confirmé par le dosage des MIA. Pour mieux comprendre les paramètres qui contribuent aux effets du procédé et aux effets de génotype, une étude des caractéristiques des éléments constitutifs de la purée par un tamisage humide a été effectuée en utilisant un tamis de diamètre 80µm qui permet d'obtenir deux fractions des particules : supérieure à 80µm et inférieure à 80µm. Les résultats obtenus ont montré l'existence d'une corrélation entre la viscosité et les résultats du tamisage. Ils révèlent une corrélation entre la viscosité de la purée et la quantité des grosses particules qui ont une taille (300µm-400µm) présente dans la purée et la quantité de sérum. Plus la viscosité est élevée plus la proportion de grosses particules est élevée et plus la quantité de sérum est faible. Ces résultats ont été confirmés par la granulométrie laser et l'observation macro et microscopique des particules.

Mots clés : Purée de tomate, Cold break, Hot break, Viscosité

Abstract

This study aimed at determining the physicochemical parameters affecting the tomato puree viscosity. For this purpose, 8 samples were produced from two tomato varieties Terradou and H1311 and underwent two different heat treatments (hot break and cold break). The tomato puree is defined as a suspension of dispersed particles in an aqueous phase (serum). Experimental results show that for a heat treatment at temperatures ranging from 60 to 70°C (Cold break), PME and PG enzymes degraded the pectin which contributes to the production of a less viscous tomato puree. However, for the temperatures ranging between 90 and 95°C (Hot Break), the enzymatic activity of PME and PG is avoided keeping the cell wall's pectin intact and thus giving a more viscous product, which was confirmed by the results obtained by MIA. To better understand the parameters involved, and which contribute to the effects of both the process and the genotype, a study of the characteristics of the puree's components was carried out using a wet sieve with 80-µm meshes which provides two fractions of particles as follows: higher than 80 µm and below 80 µm. These results showed that the tomato puree, whose viscosity is high, is the one which had the greatest amount of large particles whose sizes ranged from 300 µm to 400µm, and characterized by a small quantity of serum. These results were confirmed by laser diffraction and direct optical observation. According to this study, the major parameters affecting the puree viscosity regarding the varieties was mainly the particle size, and the content of biggest particles, while modification of viscosity regarding the process was mainly related to serum viscosity.

Key words: tomato puree, cold break, hot break, viscosity

Références

- Barnes, H.A., 2000. A handbook of elementary rheology. Univ. of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Aberystwyth.
- Bayod, E., 2008. Microstructure and rheological properties of concentrated tomato suspensions during processing. Div. of Food Engineering, Dept. of Food Technology, Engineering and Nutrition, Lund Univ, Lund.
- Boualem, A., n.d. Estimation de distribution de tailles de particules par techniques d'inférence bayésienne 167.
- Cantú-Lozano, D., Rao, M.A., Gasparetto, C.A., 2000. rheological properties of noncohesive apple dispersion with helical and vane impellers: effect of concentration and particle size. *Journal of Food Process Engineering* 23, 373–385.
- Coussot P. (2005). *Rheometry of Pastes, Suspensions, and granular materials*. John Wiley & Sons, Hoboken, wiley-inte edition.
- Diaz, J.V., Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2009. Conformational Changes in Serum Pectins during Industrial Tomato Paste Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8453–8458.
- Espinosa L. (2012). *Texture de la purée de pomme : influence de la structure sur les propriétés rhéologiques et la perception sensorielle - effet du traitement mécanique*. Ph.D. thesis, AgroParisTech - Ingénierie Procédés aliments.
- Gould, W. A. (1992). *Tomato production, processing & technology*. In *Tomato production, processing & technology*.
- Hsu, K.-C., 2008. Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. *LWT - Food Science and Technology* 41, 450–459.
- Leverrier C. (2016). *Relations Structure/Propriétés de Suspensions de Particules Végétales*. Thèse, AgroParisTech- Génie des Aliments

- Lopez-Sanchez, P., Chapara, V., Schumm, S., Farr, R., 2012. Shear Elastic Deformation and Particle Packing in Plant Cell Dispersions. *Food Biophysics* 7, 1–14.
- Lopez-Sanchez, P., Nijssse, J., Blonk, H.C.G., Bialek, L., Schumm, S., Langton, M., 2011. Effect of mechanical and thermal treatments on the microstructure and rheological properties of carrot, broccoli and tomato dispersions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 207–217.
- Mohr, W.P., 1987. Tomato fruit properties affecting consistency of concentrated product. *Canadian Journal of Plant Science* 67, 881–890.
- Ouden, F.W.C., Vliet, T., 1997. Particle Size Distribution in Tomato Concentrate and Effects on Rheological Properties. *Journal of Food Science* 62, 565–567.
- Redgwell, R.J., Curti, D., Gehin-Delval, C., 2008. Physicochemical properties of cell wall materials from apple, kiwifruit and tomato. *European Food Research and Technology* 227, 607–618.
- Santiago, J.S.J., Jamsazzadeh Kermani, Z., Xu, F., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2017. The effect of high pressure homogenization and endogenous pectin-related enzymes on tomato purée consistency and serum pectin structure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 43, 35–44.
- Servais, C., Jones, R., Roberts, I., 2002. The influence of particle size distribution on the processing of food. *Journal of Food Engineering* 8.
- Sila, D.N., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., De Roeck, A., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2009. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II-Structure-Function Relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 86–104.
- Tanglerpaibul, T., Rao, M.A., 1987. Rheological Properties of Tomato Concentrates as Affected by Particle Size and Methods of Concentration. *Journal of Food Science* 52, 141–145.
- Van Buggenhout, S., Sila, D.N., Duvetter, T., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2009. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part III-Texture Engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 105–117.

Yoo, B., Rao, M.A., 1994. EFFECT OF UNIMODAL PARTICLE SIZE AND PULP CONTENT ON RHEOLOGICAL PROPERTIES OF TOMATO PUREE. Journal of Texture Studies 25, 421–436.

[1] <https://www.planetoscope.com/fruits-legumes/1848-production-de-tomates-en-france.html>
31/07/2018

ANNEXE A

	<h3>Protocole</h3>	Réf : PTL Activité_enzymatique_Extraction_Dosage_AE_PG-01 page 4/8
---	--------------------	--

2-3-2 Matériel analysé

Chair de fruit (abricot) congelé à -80 °C et broyé à l'azote liquide.

3 - MODE OPERATOIRE

3-1 Préparation des solutions et tampons

a) Préparation du substrat : démethylation de la pectine de pomme

- Mélanger 12 g de pectine de pomme dans 1 L H₂O à 4°C.
- Ajuster à pH=12 avec NaOH 1N (il faut environ 30-50 mL) pendant les deux premières heures de dissolution.
- Laisser une nuit sous agitation à 4°C.
- Ajouter HCl 0.1N jusqu'à pH=4.5.
- Ajouter 3 L d'éthanol 96° pour gélifier la pectine.
- Filtrer le mélange dans un fritté gros (Ø0) sous vide.
- Laver le fritté par échange de solvant : 2x Ethanol 60°, 2x Ethanol 96° et 2x Acétone.
- Sécher complètement le fritté à l'étuve (40-50°C) plusieurs jours.
- Garder la pectine déméthylée (pectate) dans un dessiccateur.

b) Solution substrat : Pectate 0.3% dans tampon acétate 0.05 M pH 5.0 – azide de sodium 0.01%

- Acétate de sodium 0.05 M : 0.410 g acétate de sodium (anhydre) dans 100 mL H₂O.
- Acide acétique 0.05 M : 143 µL acide acétique glacial dans 100 mL H₂O.
- Solution substrat : 0.3 g pectate dans 70 mL acétate de sodium 0.05 M et 30 mL acide acétique 0.05 M. Agiter toute la nuit à 4°C.
- Pour conserver la solution plusieurs semaines (à 4°C), ajouter 0.01 g azide de sodium (NaN₃)



Attention avec la manipulation de l'azide de sodium, il est très toxique !

c) Solution d'extraction : Tampon acétate 0.2 M pH 5.6 – NaCl 1 M – 1% PVPP

- Pour 100 mL: dissoudre 1.49 g acétate de sodium, 103 µL acide acétique, 5.84 g NaCl et 5.84 g PVPP, et ajouter H₂O jusqu'à 100 mL (fiOLE jaugée). Le PVPP ne se dissout pas, il reste en suspension.
- À conserver à 4 °C.

d) Tampon borate 0.1 M pH 9.0

- Pour 100 mL: Dissoudre 3.81 g de tétraborate de sodium décahydrate dans ~80 mL H₂O (il faut chauffer un peu). Ajuster pH 9.0 avec HCl 1.2 N et ajouter de l'eau jusqu'à 100 mL (fiole jaugée).
- À conserver à 4 °C dans une bouteille brune protégée avec une feuille d'aluminium.
 À 4 °C le tampon borate forme des cristaux. Avant son utilisation, chauffer doucement le tampon et mélanger jusqu'à sa dissolution.

e) Solution 2-cyanoacetamide 1%

- Pour 100 mL: dissoudre 1.00 g de 2-cyanoacetamide dans 100 mL H₂O.
- À conserver à 4 °C dans une bouteille brune protégé avec une feuille d'aluminium.

f) Gamme d'étalonnage d'acide monogalacturonique

- Solution mère d'acide monogalacturonique 16000 µM:
 dans une fiole, peser 33.9 mg d'acide monogalacturonique et compléter à 10 mL avec le tampon acétate 0.05M pH 5.0
- Tampon acétate 0.05M pH 5.0:
 Mélanger 100 mL de tampon acétate 0.05M pH 5.0 et 100 mL d'acide acétique 0.05M, si besoin ajuster le pH à 5.0

Préparer chaque jour les points de gamme à partir de la solution mère :

Point de gamme	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Volume eau UP (µL)	1000	995	990	980	950	925	900	800
Volume solution mère (µL)	0	5	10	20	50	75	100	200
Concentration glucose (g/L)	0	80	160	320	800	1200	1600	3200

3-2 Extraction

Les sucres sont des interférents de l'analyse qui provoquent des variations inattendues et aléatoires des résultats. C'est pour cela qu'une première étape de rinçage avec 0.2% Na₂S₂O₅ (x2) est nécessaire, notamment pour les fruits (ex. abricot).

a) Rinçage

- Peser 0.5 g d'échantillon (frais et récemment broyé ou broyé à l'azote et conservé à -80°C) dans un tube eppendorf 2 mL et ajouter 1 mL de Na₂S₂O₅ 0.2% (0.2 g Na₂S₂O₅ dans 100 mL H₂O) à 4 °C. Bien mélanger au vortex. Conserver les tubes dans une boîte contenant de la glace.

- Agiter au vortex avec l'adaptateur multitube (position vitesse 3) pendant 5 minutes dans la chambre froide et puis centrifuger à 13000 rpm (16,000 g) pendant 2 min à 4 °C.
- Jeter le surnageant et rajouter 1 mL de Na₂S₂O₅ 0.2% à 4 °C. Bien mélanger au vortex.
- Répéter l'agitation au vortex avec l'adaptateur multitube (position vitesse 3) pendant 5 minutes dans la chambre froide et centrifuger à 13,000 rpm pendant 2 min à 4 °C.
- Jeter le surnageant et rajouter 1 mL de solution d'extraction à 4 °C. Bien mélanger au vortex.

b) Extraction

- Agiter au vortex avec l'adaptateur multitube (position vitesse 3) pendant 1 heure dans la chambre froide puis centrifuger à 13000 rpm durant 30 min à 4 °C.
- Garder des aliquotes (min. 100 µL) du surnageant (extrait PG) dans des tubes eppendorf à bouchon à viser, plonger dans l'azote liquide et garder à -80°C jusqu'à l'analyse.

3-3 Analyse activité PG.

Le tampon borate cristallise à 4°C, le sortir et chauffer légèrement pour dissoudre tous les cristaux avant utilisation.

La dilution de l'extrait PG avec la solution de NaCl 1M dans la solution substrat permet avoir une concentration de NaCl finale approprié pour ne pas inhiber l'activité PG, sans besoin de dialyse des extraits.

a) Incubation

- Placer 2 eppendorfs (1.5 mL) par échantillon dans le thermomixeur Eppendorf (si 2 réplicats par échantillon) avec 1000 µL de solution substrat. Fixer la température à 35 °C (température optimale pour la PG de l'abricot, à tester pour d'autres fruits).
- Ajouter 50 µL d'extrait PG dans l'eppendorf (mélange enzyme-substrat), vortexer légèrement, démarrer le chronomètre et laisser incuber le mélange dans le thermomixeur (agitation 400 rpm).
- Préparer un tube en verre (hémolyse, 10 mL) avec 500 µL de tampon borate pour chaque réplikat et temps d'incubation à analyser ainsi que pour chaque point de la gamme étalon.
- Prélever 100 µL du mélange enzyme-substrat à 3 temps d'incubation différents (au moins) et les disposer dans un tube en verre avec du tampon borate (arrêt de la réaction enzymatique).

Les temps d'incubation sont fonction de l'activité PG des extraits.

Pour la tomate, 30, 60 et 90 min peuvent être suffisantes.

Pour l'abricot, des longues incubations d'au moins 24h sont nécessaires.

Pour la pomme, des incubations de 6, 24 et 30 heures sont nécessaires.

Gamme étalon : Ajouter 100 µL des solutions d'acide galacturonique dans des tubes avec 500µl de tampon borate. Continuer comme avec les échantillons.

b) Réaction groupes réductrices-cyanoacétamide

- Ajouter 100 µL de solution de 2-cyanoacétamide 1% et vortexer légèrement.
- Placer les tubes dans un bain mairie à 100 °C pendant 10 min.
- Refroidir les tubes dans l'eau-glace (10 min environ).

c) Lecture absorbance (spectrophotomètre à microplaque).

- Transférer 200 µL des points de gamme et des échantillons dans une microplaque UV.
- Mesurer l'absorbance à 276 nm, à température ambiante (moyenne de 3-4 points centrales).

4 – RESULTATS, CALCULS ET EXPRESSION DES RESULTATS

Une unité d'activité (U) PG est définie comme la quantité d'enzyme que produit 1 µmol de groupes réducteurs par minute à partir de l'acide polygalacturonique à pH 5.0 à 35 °C.

- Créer la courbe d'étalonnage avec les valeurs d'absorbance de la gamme étalon. On admet que la concentration d'acide monogalacturonique est proportionnelle à celle des groupes réducteurs.

$$\text{Abs} = a \times C(\mu\text{M}) + b$$

- Pour tous les temps d'incubation, calculer la concentration de groupes réducteurs générés avec la courbe d'étalonnage (µM) et construire la courbe µM (axe Y) – minutes (axe X) :

$$C(\mu\text{M}) = a' \times t(\text{min}) + b'$$

Écarter les premiers points de la cinétique si la pente n'est pas linéaire au début (si c'est le cas, l'absorbance est dû à la présence des sucres ou des autres interférents, ce n'est pas l'activité enzymatique). C'est pour cela qu'il est nécessaire de faire au moins trois temps d'incubation différents.

La pente de la courbe de tendance (a') est le débit en µmol L⁻¹ min⁻¹ dans la solution d'incubation.


- Calculer l'activité PG dans l'échantillon en utilisant les facteurs de dilution :

Volume du substrat = 1 mL
 Volume de l'extrait = 0.05 mL
 Volume de l'incubation = **1.05 mL**
 Aliquote d'extrait : 50 µL ≈ **0.05 g**

Masse de la solution d'extraction = 1 g
 Masse d'échantillon = m = **0.50 g**
 Masse totale de l'extrait ≈ **1.50 g**

$$U (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}) = a' \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{min}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1.050 \text{ mL}}{0.050 \text{ mL}} \times \frac{1.5 \text{ g}}{0.5 \text{ g}}$$

2-2 Réactifs et solvants

Nom	Qualité ou référence	Dangerosité	N° CAS
Chlorure de sodium	Prolabo (VWR) 27810.295. Réf. INRA 271.	N'est pas une substance ni un mélange dangereux.	7647-14-5
Hydroxyde de sodium	Dilutions de NaOH concentré	 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.	1310-73-2
Pectine de pomme ou de citrus (70-75% esterification)	Sigma 76282.	N'est pas une substance ni un mélange dangereux.	9000-69-5
Phosphate de potassium monobasique anhydre (KH ₂ PO ₄)			7778-77-0
Phosphate de sodium dibasique anhydre (Na ₂ HPO ₄)			7558-79-4

2-3 Matériels

- Fioles jaugées (10, 100, 1000 mL)
- Vortex et adaptateur pour des tubes eppendorf
- Centrifugeuse et rotor pour des tubes eppendorf.
- Bain marie avec circulation
- Double enveloppe avec tuyaux connectés au bain marie.
- Titreur

3 - MODE OPERATOIRE

3-1 Préparation des solutions et tampons

a) Tampon d'extraction: Phosphate 0.2 M – NaCl 1 M pH 7

- Pour 100 mL : Dissoudre 2.84 g phosphate de sodium dibasique anhydre (Na₂HPO₄), 0.94 g phosphate de potassium monobasique anhydre (KH₂PO₄) et 5.84 g NaCl (dans un bécher avec ~90 mL eau distillée). Ajuster à pH 7 et puis ajuster le volume à 100 mL avec une fiole jaugée.
- À conserver à 4 °C.

b) Solution substrat :

- Pour 100 mL : Dissoudre 0.35 g pectine de pomme et 0.684 g NaCl dans un bécher, compléter avec de l'eau distillée. Agiter vivement et chauffer très légèrement pour bien dissoudre la pectine.
- À conserver à 4 °C 1-2 jours

3-2 Extraction

- La solution d'extraction cristallise au réfrigérateur, la sortir et dissoudre les éventuels cristaux avec un agitateur magnétique.
- Préparer autant de tubes eppendorf de 2 mL que d'échantillons et les placer dans la glace.
- Peser 0.50 g d'échantillon (broyé et conservé à -80 °C), utiliser l'azote liquide pour manipuler la poudre à -80°C.
- Ajouter 1 mL de solution d'extraction, mélanger bien au vortex et laisser sous agitation pendant 2 h à 4 °C (vortex avec adaptateur pour des eppendorfs en chambre froide).
- Centrifuger à 16,000 g (13,000 rpm) durant 30 min à 4 °C.
- Transférer des aliquotes d'au moins 300 µL d'extrait dans des nouveaux tubes eppendorf, congeler avec l'azote et conserver à -80 °C.

3-3 Dosage de l'activité pectin methyl esterase (PME)

a) Préparation titreur :


- Installer la burette de 5 mL branchée à la bouteille contenant de la soude NaOH 0.1 N.
- Démarrer le logiciel « Tiamo ».
- Purger la burette : Dans les options « Manuel » → choisir « Moteur de burette » → dans l'onglet « Préparer » taper sur « Start ».
- Calibrer électrode : « Poste de travail » → Dans la fenêtre « Analyses » → Données d'échantillon : méthode calibration (suivre les indications).

b) Préparation incubation (Document 2 informations complémentaires) :

- Brancher la double enveloppe au bain mairie et la placer sur l'agitateur 801. Remplir la double enveloppe d'eau et poser un bécher (de 25 mL) à l'intérieur.
- Ajouter 20 mL de solution substrat dans le bécher, avec un petit barreau et démarrer l'agitation (« Manuel » → Arbre : Agitateur 1 (801) → Vitesse : 3)
- Attendre que la solution substrat atteigne 35 – 35.5 °C (contrôler à l'aide d'une sonde à température). Pour cela, il faut avoir le bain mairie réglé à 36-37°C, en fonction de la perte de température au cours des tuyaux.
- Décongeler l'extrait enzymatique (gardé à -80°C) dans le bain mairie en agitant le contenu.

c) Lancer essai enzymatique (Document 3 informations complémentaires):

- « Poste de travail » → Fenêtre : « Analyses » → Dans les « Données d'échantillon », choisir méthode « cinétique enzymatique PME » et identifier échantillon.
- Taper sur « Start ». Ensuite le titreur ajoute du NaOH 0.1 N jusqu'à que la solution substrat atteigne pH 7.
- Attendre la demande du logiciel « ajouter extrait enzymatique » et ajouter 250 µL d'extrait (si nécessaire, adapter le volume en fonction de l'activité de l'extrait). Si le pH descend ou monte en dehors de la palge 6.9-7.0, il est recommandé de l'aider à rétablir le pH à environ 6.9 avec de l'ajout d'HCl ou NaOH dilué.
- La cinétique s'arrête automatiquement après 30 min.

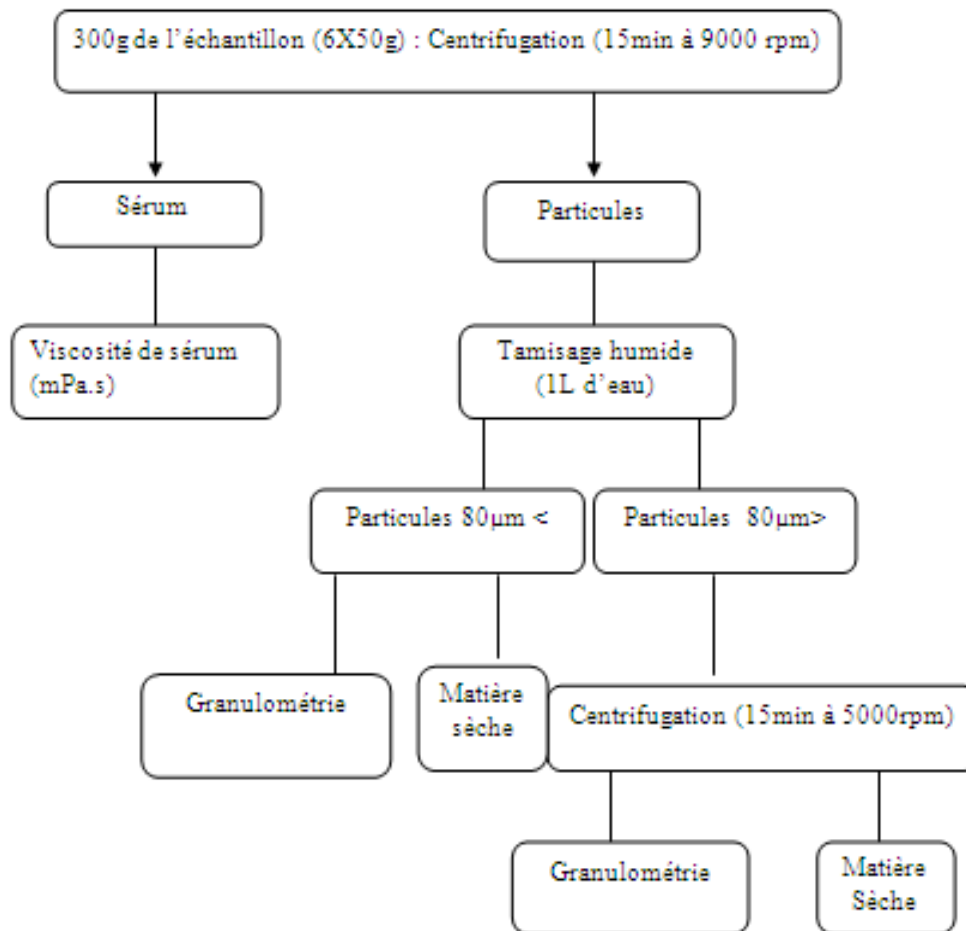
	<h2>Protocole</h2>	Réf: PTL- Activité_enzymatique_extraction_dosage_ AE_PME-01 page 5/10
---	--------------------	--

d) Copier points de la titration :

- « Base données » → Choisir essai dans la fenêtre « table des déterminations » → taper sur l'onglet « cinétique » dans la fenêtre « Courbes 1 » → sur la courbe, entrer dans la liste des points de mesure (clic droit). Les points de mesure peuvent être sauvegardés dans un fichier Wordpad et mis sur Station pour travailler ensuite avec Excel.

ANNEXE B

Schéma général de protocole d'étude structurale des purées



ANNEXE C :

Tableau: les caractéristiques biochimiques des purées utilisées

Variété	Traitement	Cuisson	pH	IR%	AT (meq/100g)	MS%	MIA%
Terradou	100	CB	4,20	8,6	8,96	9,20	0,18
Terradou	50	CB	4,19	8,9	8,75	8,17	0,16
Terradou	100	HB	4,31	8,7	8,16	9,22	0,19
Terradou	50	HB	4,40	8,4	7,73	7,67	0,17
H1311	100	CB	4,21	8,1	7,50	7,78	0,18
H1311	50	CB	4,27	9,0	8,06	9,73	0,18
H1311	100	HB	4,41	8,0	7,12	9,25	0,21
H1311	50	HB	4,39	8,6	6,69	9,39	0,19

PS : MIA% c'est par rapport à la matière sèche.