

N° d'ordre : 60

50376  
1986  
183

50376  
1986  
183

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES**

option «MICROBIOLOGIE»

par

Mohamed EL YACHIOUI



## **PRODUCTION ET ETUDE D'UNE $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE BACTERIENNE**

*Exemplaire corrigé après avis du jury*

Soutenue le 20 Novembre 1986 devant le Jury composé de

Président	M.	J.	GUILLAUME,	Professeur
Rapporteur	M.	J.	BRAKEL,	Professeur
Examineurs	M.	R.	TAILLIEZ,	Professeur
	M.	J.C.	DERIEUX,	Professeur
	M.	A.	VERBERT,	Professeur

*A ma mère,*

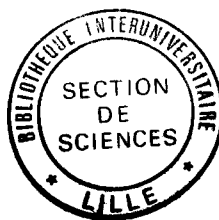
*A la mémoire de mon père,*

*A mon frère Si Mohamed,  
qui m'a toujours encouragé tout-au-long  
de mes études.*

*Les résultats obtenus n'auraient pu être  
sans son aide.*

*A mes deux petits frères : Adil et Adnane et toute ma famille "Boudess".*

*En témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.*



Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de **Monsieur le Professeur J. GUILLAUME**. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir permis, par ses précieux conseils, de réaliser ce travail.

Toute ma reconnaissance à **Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ** pour m'avoir intégré dans son équipe, avoir suivi nos travaux avec intérêt et pour être rapporteur de cette thèse.

Ma reconnaissance s'adresse également à **Monsieur le Professeur J. BRAEKEL**, de la Faculté des Sciences de Gembloux (Belgique), pour sa participation à l'élaboration de ces travaux et de ce mémoire, et de me faire l'honneur d'être le rapporteur de ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à **Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX** et **Monsieur le Professeur A. VERBERT** pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Monsieur J.P. HORNEZ** et **Monsieur D. OCHIN** pour leur excellente collaboration et disponibilité, ainsi que pour leur aide et conseils, tant scientifiques que personnels, que j'ai beaucoup appréciés.

Je tiens à associer à cet ouvrage **Monsieur A. DECQ**, pour avoir collaboré à ces travaux. Je le remercie des nombreux et utiles conseils techniques et scientifiques. Sa gentillesse est le reflet de sa valeur scientifique.

Je remercie très sincèrement l'ensemble du personnel du Laboratoire, pour l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée et pour leur aide.

J'adresse mes remerciements au Service de l'Accueil des Etudiants Etrangers du C.R.O.U.S., et surtout **Monsieur VANEQK**, pour leur gentillesse et pour leur aide précieuse.

A tous mes camarades qui m'ont prodigué conseils et encouragements constants, dans une atmosphère exceptionnelle d'amitié.

Enfin, je remercie **Madame M. BONNIER**, qui a réalisé la dactylographie de cette thèse et de mes communications scientifiques.

## TABLE DES MATIERES

GENERALITES.....	1
I - LES POLYFRUCTOSANES.....	1
1. Situation des polyfructosanes parmi les polysaccharides.....	1
2. Etudes des polyfructosanes.....	3
2.1 - Les polyfructosanes chez les bactéries.....	3
2.2 - Les polyfructosanes chez les plantes.....	3
3. Propriétés et structure des polyfructosanes.....	7
4. Biosynthèse des polyfructosanes.....	7
4.1 - Polyfructosane (levanes) d'origine bactérienne.....	9
4.2 - Polyfructosane chez les plantes.....	10
5. Etude des propriétés d'un fructosane : l'inuline.....	14
II - ETUDE DES PLANTES RICHES EN POLYFRUCTOSANES.....	16
1. Le topinambour ( <i>Heliantus tuberosus</i> ).....	16
1.1 - Aspect agronomique.....	16
1.2 - Composition chimique et rendement en inuline.....	16
2. Le dahlia .....	17
3. La chicorée ( <i>Cichorium intybus</i> ).....	19
3.1 - Aspect agronomique.....	19
3.2 - La technique de forçage de l'endive.....	20
3.3 - Composition physico-chimique.....	20
3.4 - La valeur alimentaire des carottes d'endive après forçage...	22
4. Conservation des racines.....	22
5. - Exploitation des plantes riches en polyfructosanes.....	23
5.1 - L'hydrolyse chimique.....	24
5.2 - L'hydrolyse enzymatique.....	24

III - ETUDES DES $\beta$ FRUCTOFURANOSIDASES.....	25
1. Les enzymes spécifiques des liaisons $\beta 2 \rightarrow 6$ .....	25
2. Les enzymes spécifiques des liaisons $\beta 1 \rightarrow 2$ .....	25
2.1 - Chez les plantes.....	25
2.2 - Chez les moisissures.....	26
2.3 - Chez les levures.....	26
2.3.1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
2.3.2 - <i>Kluyveromyces fragilis</i> .....	27
2.3.3 - Chez les autres levures.....	28
3. $\beta$ -fructosidasiques non spécifiques.....	29
4. La $\beta$ fructofuranosidase chez les bactéries.....	29
IV - ETUDE DE LA REGULATION DU SYSTEME ENZYMATIQUE EXTRACELLULAIRE.....	31
1. Effet glucose.....	31
2. Rôle de l'AMPc.....	31
3. Amélioration de la production d'enzyme.....	32
V - BUT DU TRAVAIL.....	33
MATERIEL ET METHODES.....	35
I - MATERIEL BIOLOGIQUE.....	35
II - MATERIEL VEGETAL.....	35
III - LES MILIEUX DE CULTURE.....	35
1. Milieu synthétique non tamponné.....	35
2. Milieu synthétique tamponné.....	35
3. Milieux de cultures riches.....	36
- milieux liquides.....	36
- milieux gélosés .....	36
4. Milieux de conservation.....	36
4.1 - Milieu solide.....	36
4.2 - Milieu liquide.....	36
5. Solutions diverses.....	37

IV - PROCÉDES DES CULTURES BACTÉRIENNES.....	37
1. Cultures en tubes.....	37
2. Cultures en flacons.....	37
3. Cultures en biophotomètre.....	38
4. Cultures en fermenteur.....	38
4.1 - Description du matériel.....	38
4.2 - Conduite de la fermentation.....	40
4.2.1 - Préculture.....	40
4.2.2 - Inoculation du fermenteur.....	40
4.2.3 - Déroulement et surveillance de la fermentation.....	40
V - MUTAGÈNESE.....	40
VI - TECHNIQUES ENZYMATIQUES.....	41
1. Purification d'enzyme.....	41
1.1 - Dialyse.....	41
1.2 - Purification au sulfate d'ammonium.....	41
1.3 - Filtration moléculaire.....	41
1.3.1 - Gel de Sephadex G25.....	42
1.3.2 - Gel de filtration "Ultrogel A.C.A 34".....	42
1.4 - Chromatographie sur D.E.A.E. cellulose.....	43
1.5 - Chromatographie d'affinité.....	43
1.6 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	43
1.7 - Détermination de la masse moléculaire.....	44
1.7.1 - Par filtration moléculaire sur Sephadex 6B.....	44
1.7.2 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à différentes concentrations.....	44
1.8 - Détermination de la masse moléculaire des sous unités.....	46
2. Dosages enzymatiques.....	49
VII - TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	49
1. Dosage des sucres.....	49

1.1 - Méthodes colorimétriques.....	49
- Sucres totaux.....	49
- Sucres réducteurs.....	49
- Dosage spécifique du glucose et fructose.....	50
1.2 - Chromatographie des fructosides.....	50
1.2.1 - Chromatographie sur gel de filtration.....	50
- Sephadex G 25.....	50
- Biogel P-2.....	50
1.2.2 - Chromatographie sur couche mince.....	50
1.2.3 - Chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.)...	51
2. Dosage des protéines.....	51
a) Technique de LOWRY.....	51
b) Méthode de SCOPES.....	53
c) Méthode de BRADFORD .....	53
3. Antibiotiques.....	53
4. Matière sèche.....	54
VIII - EXTRACTION DES GLUCIDES.....	54
1. Extraction pour analyse.....	54
2. Extraction à chaud par diffusion.....	54
3. Technique de décoloration.....	55
4. Hydrolyse acide.....	55
RESULTATS.....	56
CHAPITRE I - ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES GLUCIDES DE LA RACINE DE CHICOREE.....	56
1. Analyses qualitatives.....	56
1.1 - Chromatographie de perméation.....	56
1.1.1 - Etalonnage des colonnes.....	56

1.1.2 - Analyse d'un extrait végétal : détermination de la répartition des fructosanes et des glucides simples...	56
1.2 - Chromatographie sur couche mince.....	59
2. Analyses quantitatives.....	64
2.1 - Variation de la composition en glucide durant la croissance de la racine.....	64
2.2 - Variation de la composition en glucide de la racine au cours du forçage.....	64
3. Concentration en sucres totaux du jus d'extraction par diffusion aqueuse à haute température.....	70
4. Conclusion.....	73
CHAPITRE II : PRODUCTION DE L'ENZYME.....	74
1. Mode de sélection de la souche.....	74
1.1 - Repérage en milieu gélosé.....	74
1.2 - Repérage en milieu liquide.....	76
1.3 - Etude de la croissance de la souche sélectionnée sur différents $\beta$ fructosides.....	76
2. Mise en évidence et localisation de l'activité enzymatique.....	80
CHAPITRE III : PARAMETRES MODIFIANT L'APPARITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	83
1. Influence de la température.....	83
2. Influence du pH.....	83
3. Influence de la source de carbone.....	83
3.1 - En croissance bactérienne.....	83
3.2 - Essai d'induction en non prolifération.....	85
4. Influence de la source d'azote.....	90
5. Effet des sels métalliques sur la biosynthèse de l'enzyme.....	90
6. Etude de l'apparition d'activité enzymatique dans le milieu de culture au cours de la croissance en présence d'inuline. Culture en fermenteur.....	90
7. Discussion.....	93



CHAPITRE IV : PURIFICATION DE L'ENZYME ETUDIEE.....	96
1. Obtention de l'extrait enzymatique.....	96
2. Purification partielle par relargage au sulfate d'ammonium.....	96
3. Purification par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose.....	96
4. Filtration moléculaire sur Ultrogel ACA 34.....	99
5. Séparation par chromatographie d'affinité.....	99
6. Bilan de la purification.....	99
CHAPITRE V : PROPRIETES DE L'ENZYME PURIFIEE.....	101
1. Variation de l'activité enzymatique en fonction du pH.....	101
2. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la température...	103
2.1 - Action de la température sur la vitesse d'activité.....	103
2.2 - Etude de la stabilité thermique.....	103
a) Stabilité aux températures basses.....	105
b) Stabilité aux températures élevées.....	105
3. Action des effecteurs sur l'activité enzymatique.....	105
4. Mode d'action de l'enzyme.....	109
5. Détermination des constantes de MICHAELIS.....	109
CHAPITRE VI : STRUCTURE DE L'ENZYME PURIFIEE.....	112
1. Détermination de la masse moléculaire.....	112
1.1 - Filtration sur gel de sépharose 6 B.....	112
1.2 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	112
2. Masse moléculaire des sous-unités.....	112
3. Recherche des sucres dans la préparation enzymatique.....	114
5. Composition qualitative en acides aminés.....	114
6. Etude des groupements intervenant dans l'activité enzymatique....	116
7. Conclusion et discussion.....	120
CHAPITRE VII : REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA $\beta$ FRUCTO-FURANOSIDASE EXTRACELLULAIRE.....	123
1. Etude de l'effet glucose sur la biosynthèse de l'enzyme.....	123

1.1 - Effet du glucose en présence des différents $\beta$ fructosides.....	123
1.2 - Effet du glucose dans différentes conditions en présence d'inuline.....	123
1.2.1 - Effet du glucose à différentes concentrations.....	123
1.2.2 - Effet du glucose ajouté en phase exponentielle de croissance...	123
1.2.3 - Mise en évidence d'une diauxie.....	127
1.3 - Discussion.....	127
2. Isolement d'un mutant résistant à l'effet glucose.....	129
2.1 - Mutagénèse.....	129
2.2 - Courbe de survie.....	129
2.3 - Enrichissement.....	131
2.4 - Sélection du mutant.....	131
2.5 - Caractéristique du mutant retenu.....	131
2.6 - Croissance et production de l'enzyme par le mutant.....	131
2.6.1 - Etude en Erlen-Meyer sur différentes sources de carbone...	131
2.6.2 - Etude en fermenteur.....	131
2.7 - Influence de la mutation sur la nature du système enzymatique...	135
2.8 - Discussion.....	135
CHAPITRE VIII - ESSAI DE PRODUCTION DU FRUCTOSE PAR HYDRO- LYSE ENZYMATIQUE.....	137
1. Etude de la cinétique d'hydrolyse de l'inuline pure.....	137
2. Cinétique d'hydrolyse d'un extrait de racine d'endive.....	139
3. Comparaison entre l'hydrolyse chimique et l'hydrolyse enzymatique...	139
CONCLUSION GENERALE.....	143
BIBLIOGRAPHIE.....	147

## ABREVIATIONS

AMPc	Adénosine 3' - 5' monophosphate cyclique
Con A	Concanavaline A
C.P.R.	Cyclic AMPc receptor proteine
D.E.A.E.	Diethyl-amino-ethyl
D.O.	Densité optique
D.P.	Degré de polymérisation
EDTA	Ethylene diamine-tetra-acétique
H.P.L.C.	Chromatographie liquide à haute performance
$\frac{I}{S}$	Inuline sur saccharose
N.B.S.	N. bromo succinimide
N.E.M.	N éthyl maleimide
nm	Nanomètre
N.T.G.	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
S.D.S.	Dodecyl sulfate de sodium
R.P.M.	Tours par minute
T.R.	Temps de rétention

## GENERALITES

### I - LES POLYFRUCTOSANES

#### 1) Situation des polyfructosanes parmi les polysaccharides

A l'heure actuelle, les polysaccharides, comme les protéines et les acides nucléiques, retiennent l'attention. Ils constituent la masse essentielle de la matière organique des végétaux, des animaux et des microorganismes.

La cellulose, la chitine, l'hémicellulose et mannane servent essentiellement de substances de structure et de support ; le glycogène et l'amidon sont des substances de réserves.

Les fonctions biologiques de nombreux polysaccharides, surtout dans le règne végétal, ne sont pas entièrement connues.

Une meilleure compréhension de leurs rôles passe par une connaissance approfondie de leur structure fine, des mécanismes de leur synthèse et de leur dégradation.

Les études de structure de nombreux polysaccharides ont été facilitées par l'utilisation d'enzymes dont la spécificité pour les liaisons glucosidiques est très étroite. C'est le cas des polyfructosanes qui sont des polysaccharides possédant une structure d'unités fructose, reliées en majorité par des liaisons  $\beta$  fructosides.

Les polysaccharides sont des polymères d'hydrate de carbone dont le poids moléculaire va de quelques milliers à plusieurs millions. Ces polymères sont constitués de chaînes linéaires ou ramifiées. La première classification des polysaccharides a été faite selon la structure chimique par **WHISTLER et SMART (1953)** qui distinguent deux types principaux :

- les homopolysaccharides linéaires qui ne contiennent qu'une seule espèce de monosaccharide : les glycanes, les fructosanes, les mannanes ;

- les hétéropolysaccharides qui contiennent deux ou plusieurs types d'unités monosaccharidiques comme les arabinoxylanes et les glycomannanes.

Le TABLEAU I situe la position des fructosanes dans la classification de **HORTON et WELFROM (1963)**.

TYPE	DENOMINATION	EXEMPLES
Homopolysaccharides linéaires	Glucanes  Galactanes  Mannanes Fructanes	Cellulose, amylose, chitine, laminarane, lichenane, polysaccharides du crown-gall  Agar, carrageenane, galactanes pectiques  Mannanes du corozo, du salep <u>Inuline</u>
Homopolysaccharides ramifiés	Glucanes  Galactanes Mannanes  Arabinanes Fructanes	Glycogène, amylopectine, amidon des floridés, dextrans bactériens, pyrodextrines  Galactane d' <u>Hélix</u>  Mannanes de levures, mannane de <u>Porphyra umbilicalis</u>  Arabinane d'arachide  Asparagosane, irisane, sinistrane, <u>levanes bactériens</u>
Hétéropolysaccharides	Glucomannoglucanes  Galactomannoglucanes Arabinogalactoglucanes  Arabinoxyloglucanes  Divers	Glucomannoglucanes de l'hémicellulose des conifères  Guarane, gomme de caroube  Arabinogalactoglucanes de l'hémicellulose des conifères  De même dans l'hémicellulose des conifères  Quelques gommages et mucilages végétaux
Hétéropolysaccharides (contenant des sucres neutres et des acides uroniques)	Glucuronoxyloglucanes  Autres	Hémicellulose B des feuilles  Quelques gommages et mucilages végétaux
Glucuronanes (contenant seulement des acides uroniques)	Galactorunanes  Guluronomannuronoglucanes	Substances pectiques  Acides alginiques
Mucopolysaccharides (contenant des sucres aminés et des acides uroniques)		Hépanine, acide hyaluronique sulfate de chondroïtine substances des groupes sanguins

**TABLEAU 1** : Classification des polysaccharides en fonction de leur structure chimique (d'après HORTON et WOLFROM, 1963).

## 2) Etudes des polyfructosanes

Les polyfructosanes sont des polymères du fructose que l'on rencontre chez certaines bactéries et chez diverses plantes.

### 2.1 Les polyfructosanes chez les bactéries :

Ces polymères sont connus chez les bactéries sous le nom des "levanes". Ils ont été décrits pour la première fois chez *Bacillus subtilis* et *Azotobacter sp.* par **BEIJERINCK** en 1912. Depuis, de nombreuses espèces bactériennes ont été décrites comme productrices de levanes (TABLEAU 2 ).

D'autres levanes ont été mis en évidence chez certaines plantes (**ASPIRAL** en 1953) et chez certains champignons (**GENSHIRO KAWAI**, 1973). Les levanes de *Bacillus subtilis* les mieux étudiés sont des polymères de poids moyen pouvant atteindre 100 000 et sont constitués par des  $\beta$ -D-fructofuranosyls liés en  $\beta 2 \rightarrow 6$  et de branchements liés en  $\beta 2 \rightarrow 1$  (FIGURE 1 ) : leurs propriétés physico-chimiques sont identiques à celles des polyfructosanes des plantes (inuline).

### 2.2 Les polyfructosanes chez les plantes :

Les réserves de nature polyfructofuranosidasique ont été décrites pour la première fois par **ROSE (1804)** chez le topinambour (*Helianthus tuberosus*). Depuis lors, de nombreuses substances de ce type ont été isolées et étudiées ; la plus connue est l'inuline, que l'on rencontre chez des plantes appartenant à quelques familles de dicotyledones telles que les composées ou les campanulacées (TABLEAU 3 ).

C'est dans la famille des composés que l'on trouve les plantes les plus riches en inuline : topinambour, chicorée, dahlia, etc... D'autres fructosanes ont été mis en évidence chez des plantes monocotyledones (familles des graminées, liliacées, amyrylidées) mais ils ont été moins bien étudiés (**CUGNAC**, 1931 ; **NORMAN**, 1936 ; **ARCHOBOLD**, 1940 ; **HAMMER**, 1970 ; **TOMADA** et **COLL.**, 1973 a,b).

La présence des fructosanes dans ces plantes ne présente pas de corrélation évidente avec leur taxonomie ; au sein d'une famille, on peut trouver des plantes possédant des fructosanes à côté de plantes n'en possédant pas (**COLIN**, 1942). De même, la présence des fructosanes ne peut être liée à l'absence ou à la présence d'autres types de réserves ; c'est le cas de l'amidon, chez l'iris (*Iris foetidissima*) où les deux types de polymères peuvent être trouvés

MICROORGANISMES	LIAISONS	UNITE DE BASE DE LA CHAINE	MODE D'ANALYSE	P.M.	REFERENCES
<i>Bacillus mesentericus</i>	$\beta 2+6$	-	Acétylation, méthylation	-	HIBBERT et COLL. (1931)
<i>Bacillus subtilis</i>	$\beta 2+6$	-	Acétylation, méthylation	-	HIBBERT et BRAUNS (1931)
<i>Bacterium prunicola</i>	$\beta 2+6$	11 - 12	Acétylation, méthylation	1 800	LYNE et COLL. (1940)
<i>Bacillus megaterium</i>	$\beta 2+6$	10-11, 11-12	Acétylation, méthylation	2 140	LYNE et COLL. (1940)
<i>Bacillus vulgatus</i>	$\beta 2+6$	10-11, 11-12	Ultracentrifugation sédimentation	50 à 100.10 <sup>6</sup>	INGLMAN et COLL. (1944)
<i>Pseudomonas sp.</i>	$\beta 2+6$	10 - 12	Méthylation	-	GILBERT et STACEY (1948)
<i>Bacillus polymyxa</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	22 - 23	Oxydation périodique	4 000	MURPHY (1952)
<i>Pseudomonas prunicola</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	9 - 10	Pouvoir rotatoire	H.P.M.	BELL et DEDONDER (1954)
<i>Aerobacter levanicum</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	9 - 10	Méthylation	6.10 <sup>+7</sup>	FEINGOLD (1955)
<i>Corynebacterium sp.</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	15	Infrarouge	12,5.10 <sup>6</sup>	AVIGAD et FRINGOLD (1957)
<i>Aerobacter levanicum</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	9 - 10	Méthylation	67 x 10 <sup>6</sup>	FEINGOLD et GEHATIA (1957)
<i>Aerobacter acetigenum</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	9 - 11	Méthylation, sédimentation	-	LOEWENBERG et REESE (1957)
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	-	-	Infrarouge et diffusion	-	LOEWENBERG et REESE (1957)
<i>Pseudomonas caryophylli</i>	-	-	Infrarouge	-	FUCHS (1959)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	-	-			
<i>Pseudomonas denitrofluorescens</i>	-	-			
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-			
<i>Aerobacter levanicum</i>	$\beta 2+6, \beta 2+1$	-			
<i>Serratia kiliensis</i>	$\beta 2+6$	-			
<i>Arthrobacter sp.</i>	$\beta 2+6$	-			
<i>Bacillus subtilis</i>	$\beta 2+6$	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	$\beta 2+6$	-	Ultracentrifugation infrarouge	-	GARSCZYNSKI et COLL. (1973)
<i>Streptococcus mutans</i>	$\beta 2+6$	-	Ultracentrifugation infrarouge	-	CESKA et COLL. (1971)
<i>Actinomyces viscosus</i>	$\beta 2+6$	-	Acétylation	-	HOWELL et JARDIN (1967)



TABLEAU 2 : Répartition et propriétés chimiques des polyfructosanes (levanes) chez les bactéries.

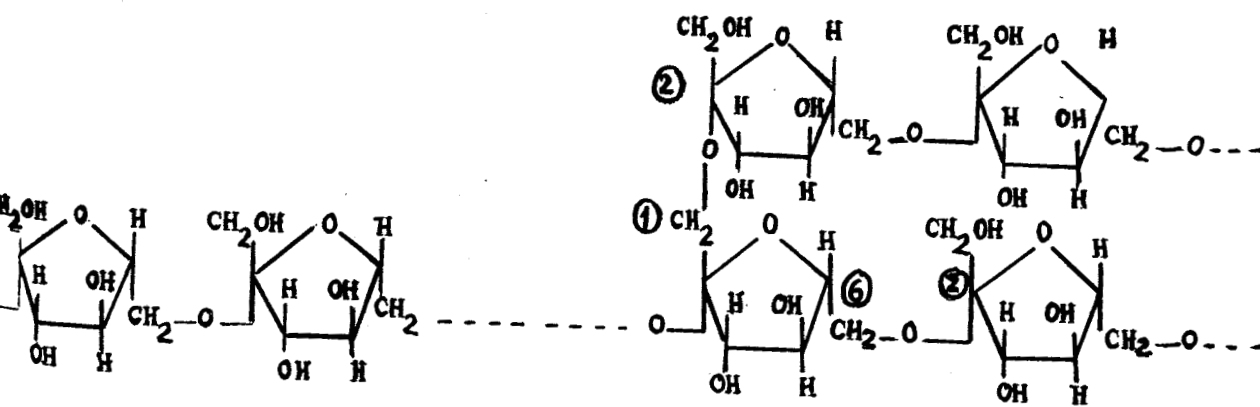
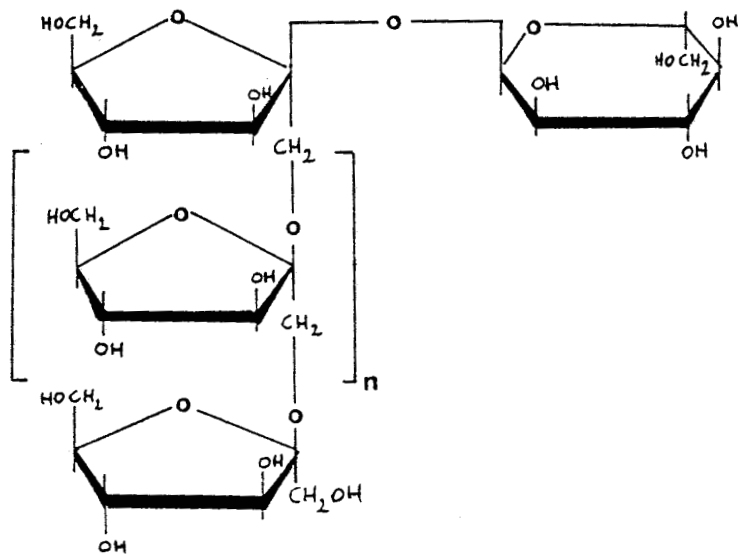


FIGURE 1 : Molécule de levane de *Bacillus subtilis*.



n : 32 - 34 residus fructose

FIGURE 2 : La molécule d'inuline. (D'après HIRST, 1950).





FAMILLE	NOM BOTANIQUE	NOM COMMUN	ORGANE	TENEUR % MS
Composées	<i>Cichorium intybus</i>	Chicorée	Racine	75
	<i>Dahlia sp.</i>	Dahlia des jardins	Tubercule	72
	<i>Heliantus tuberosus</i>	Topinambour	Tubercule	80
	<i>Inula - helinium</i>	Inule-année	Racine	32
	<i>Taraxacum officinale</i>	Pissenlit	Racine	40
Campanulacées	<i>Campanula punctata</i>	Campanule du Japon	Racine	16
	<i>Codonopsis cauceolata</i>	Conodopsis grande	Racine	40
	<i>Platycodon grandiflnum</i>	Campule	Racine	45

TABLEAU 3 : Plantes dicotyledones contenant de l'inuline (d'après BACON et EDELMAN, 1951 ; WHISTLER et SMART, 1953 ; OTA et COLL., 1979).



dans le même tissu.

Chez d'autres plantes, ces deux sortes de polymères sont présents mais contenus dans des organes différents : l'amidon dans les feuilles, les fructosanes dans les tubercules chez le topinambour, les fructosanes dans les feuilles et l'amidon dans les graines chez le blé (EDELMAN et JEFFORD, 1968).

### 3) Propriétés et structure des polyfructosanes

Tous les polyfructosanes ont des propriétés communes (WHISTLER et SMART, 1953). Ils sont composés de D-fructoses de forme furanosidique, ont un pouvoir rotatoire négatif et un pouvoir réducteur très faible ou nul. Les polyfructosanes sont hygroscopiques, solubles dans l'eau chaude et se caramélisent facilement sous l'action de la chaleur. Leur hydrolyse acide est relativement aisée. Ils ne sont pas attaqués par l'invertase des levures.

Les techniques de méthylation suivie d'hydrolyses ont permis d'entreprendre l'étude de leur structure qui est plus ou moins connue. Ces techniques permettent d'obtenir des diméthyl, triméthyl et tétraméthyl D-fructose, éventuellement des dérivés d'autres sucres séparables et identifiables par chromatographie. La présence de dérivés triméthylés en 3, 4, 6' traduit la présence de liaison  $\beta$ 1-2, alors que celle de dérivés 1, 3, 4' traduit la liaison  $\beta$ 2-6. De plus, il est possible de savoir si la chaîne est branchée ou non, cela se traduit par un taux élevé de produit di- et tétra-méthylés. On a pu ainsi séparer les polyfructosanes en deux grands groupes selon la nature de la liaison fructose-fructose : elle peut être  $\beta$ 1-2 (groupe "inuline") ou  $\beta$ 2-6 (groupe "levane" ou "phleine").

A l'intérieur de ces deux groupes, les polyfructosanes différents par la longueur des chaînes (degrés de polymérisation [D.P.]), leur éventuel branchement, la présence de D glucose.

Le TABLEAU 4 rassemble les principales caractéristiques des polyfructosanes.

### 4) Biosynthèse des polyfructosanes

L'étude des mécanismes de la biosynthèse des polysaccharides a commencé avec les travaux sur le muscle (GORI G.T., GORI C.F. et CREEN A.A., 1943). Ces auteurs ont montré que la phosphosylase présente dans le muscle provoquait la synthèse d'un polysaccharide linéaire du type amylose à partir de l' $\alpha$ -glucose-1-phosphate ; cette réaction étant d'ailleurs réversible.

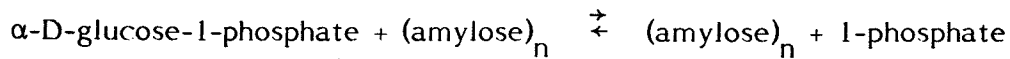
FRUCTOSANE	TYPE DE LIAISON	BRANCHEMENT	DEGRES de POLYMERISATION	PRESENCE de GLUCOSE	$\alpha$ D <sup>20</sup>
Asparragosine	$\beta$ 1-2	+	9		- 32° 5
Asphodeline	$\beta$ 1-2	?	?		- 30° 5
Graminée	$\beta$ 1-2	+	6 à 16		- 36° 5
Hordiannine	$\beta$ 2-6	±	11	+	
Inuline	$\beta$ 1-2	-	30 à 35	+	- 40°
Irisine	$\beta$ 1-2 et $\beta$ 2-6	+	-		- 51°
Uritesine	$\beta$ 1-2	±	17 à 22	+	- 28°
Levanes (plantes)	$\beta$ 2-6		3 à 36	+	- 45°
Levanes (bactéries)	$\beta$ 2-6	+	> 100	-	
Phleine	$\beta$ 2-6	±	50 à 88	+	- 50°
Poine	$\beta$ 2-6	-	-	-	- 41°
Pyrosine	$\beta$ 2-6	+	5 à 12		- 30°
Secaline	$\beta$ 2-6	+	4 à 15		- 37°
Sinistrine	$\beta$ 1-2	+	30		- 45°
Tribicine	$\beta$ 1-2 et $\beta$ 2-6	+	36		- 51°



TABLEAU 4 : Principales caractéristiques de quelques polyfructosanes.

(D'après MC DONALD, 1946 ; BELL et PALMER, 1952 ; WHISTLER et SMART, 1957 ; HIRST, 1957 ; AKAZAWA, 1965 ; AKELROD, 1965 ; SUZUKI et COLL., 1968 ; LINDBERG et COLL., 1973 ; SMITH, 1973 ; KUHBAUCH, 1974 ; TOMASIC et COLL., 1978).

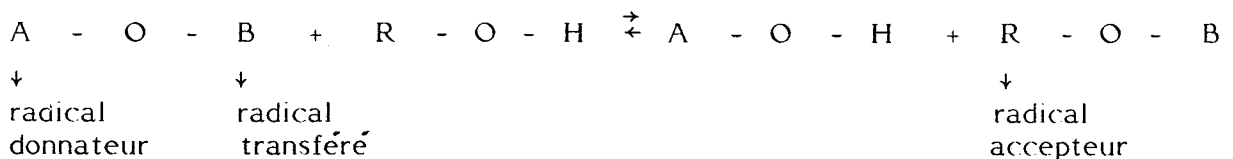
Un ose, ici le glucose, lié au phosphate dans le glucose-1-phosphate, est transféré pour former un polysaccharide suivant la réaction :



Pendant plusieurs années, cette réaction, retrouvée chez les plantes (HANES, 1940), les levures (KIESSLING, 1939), les bactéries (HEHRE, CARLSON et NEILL, 1947), est apparue comme le mécanisme général de la synthèse des polysaccharides, celle-ci se faisant essentiellement à partir d'esters phosphoriques des oses. Aujourd'hui, cependant, on ne pense plus que ce type de réaction constitue la voie physiologique normale de la synthèse des polysaccharides. Beaucoup plus vraisemblablement, la biosynthèse de la plupart des polysaccharides se fait à partir de nucléotides-sucres (DEDONDER, 1961). En partant de ces nucléotides -sucres, on a pu obtenir la synthèse aussi bien de disaccharides possédant une liaison riche en énergie (saccharose, trehalose-phosphate) que de hauts polymères (cellulose, glycogène, amidon, chitine, mucopolysaccharides). Ainsi, LELOIR et COLL. (1959) ont montré que l'incubation d'une préparation de "glycogène-synthetase" de muscle en présence d'uridine-diphosphate-glucose (4-D.P.G.) marqué par du carbone<sup>14</sup> donne du glycogène radioactif et que l'incorporation du glucose est supérieure à 80 %.

Il existe un troisième type de réaction de synthèse des polysides, dans lequel le radical donateur est un ose.

Dans ce dernier cas, un radical osyl est transféré d'un groupe de nature glucidique à un autre groupe accepteur, selon la réaction :

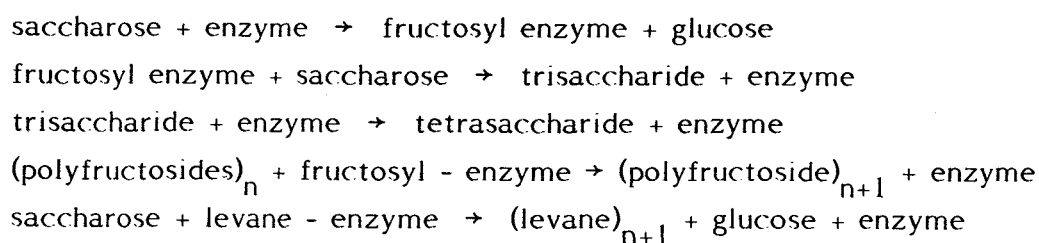


où A - O - B est le plus souvent un disaccharide, tel le saccharose ou le maltose.

#### 4.1 Biosynthèse des fructosanes (levanes) d'origine bactérienne

La levane transfructofuranosylase, découverte par HESTRIN et COLL. (1943) chez *Aerobacter levanicum* et *Bacillus subtilis* est nommée par ces auteurs : "levane-sucrase".

La levane-sucrase catalyse principalement le transfert du radical  $\beta$ -D-fructofuranosyl à partir du saccharose, selon les schémas suivants :

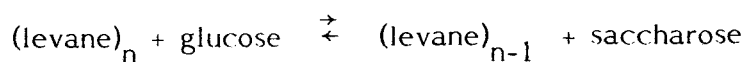


Nombreux substrats chez *Bacillus subtilis* ont montré que seuls, le saccharose et raffinose permettaient la synthèse des levanes. **HESTRIN** et **AVINERI (1944)**, avec *Aerobacter levanicum*, ont confirmé, par analyse des produits de la réaction, que la synthèse des levanes pouvait se faire à partir du saccharose et du raffinose :



La synthèse de ce polymère est toujours accompagnée d'une libération de fructose et d'une formation d'oligosides réducteurs ou non réducteurs, dont le plus important est le  $\beta$ -D-fructosyl (**DEDONDER, 1953 ; AVIGAD, HESTRIN, 1956**).

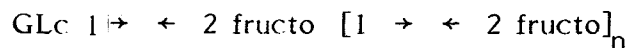
La réversibilité de la réaction a été démontrée par **PEAUD-LENOEL (1956)** ; ces auteurs ont obtenu la formation de saccharose par action d'une préparation des levanes-sucrase de *Bacillus subtilis* sur un mélange de glucose et de levane de P.M. 6 500 :



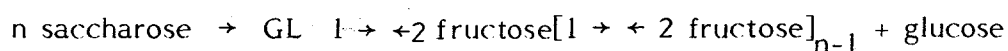
#### 4.2 Biosynthèse des fructosanes chez les plantes

Les fructosanes localisés dans la vacuole sont des réserves facilement disponibles jouant un rôle physiologique important dans le métabolisme de la plante. Ils peuvent être dégradés rapidement et utilisés pour la croissance. Ils assurent une régulation osmotique efficace et exercent un rôle au niveau de la résistance au froid.

Toutes les plantes renfermant des polyfructosanes et, en particulier le topinambour, la chicorée et le dahlia, accumulent ces glucides de réserve, sous la forme d'oligo et de polyfructoside de formule générale :



Le saccharose est le terme le moins polymérisé et l'inuline de D.P. 40 environ, le plus polymérisé (**BACON et EDELMAN, 1951**). Dans les tubercules de topinambour, ces réserves persistent au cours du repos hivernal. Suivant les espèces, une série de modifications peut se produire. Chez certaines espèces, les polymères supérieurs peuvent se dégrader aussitôt la récolte, chez d'autres, des polymères intermédiaires peuvent au contraire s'accumuler. Ces réserves sont essentiellement sous forme de fructosanes voisins de l'inuline pendant l'hiver. Utilisant des extraits de tubercules, **DEDONDER (1951)** a montré que la synthèse des fructosanes de D.P. élevé comprenant l'inuline se faisait par la réaction :

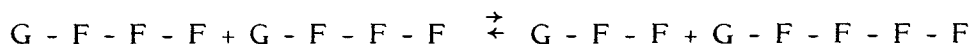


avec l'intervention d'une enzyme appelée inulosaccharase ( $\beta$ 1-2 fructane-D glucose-1 fructosyl transferase).

**EDELMAN (1966)** a montré l'existence dans les tubercules de topinambour d'une enzyme qui transfère les restes des fructosyls du trisaccharide  $1^F$ -fructofuranosyl-saccharase sur saccharose.



Cette même enzyme est par ailleurs capable d'échanger le fructosyl terminal dans la série D.P. faible, par exemple :



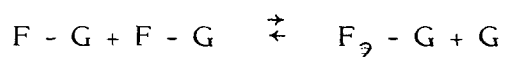
Le saccharose est la forme normale de transfert des sucres dans ces plantes; la présence de l'inulosaccharase et son rôle ont été confirmés par **SCOTT et EDELMAN (1966)**. Ils ont montré que chez le topinambour commun,

cette enzyme disparaissait après 4 semaines de conservation des tubercules. **PONTIS (1966)** a montré que cette synthèse était sous la dépendance étroite d'une régulation hormonale. Une de fructosanes de D.P. élevé, tout-à-fait analogue à celle mise en évidence sous l'action des extraits enzymatiques contenant l'inulosaccharose, est obtenue en culture de tissus sous l'influence de l'addition conjointe d'acide 2,4-dichlorphenoxyacétique (2,4 D) et de kéatine ; l'addition de 2,4 D seul ne permet pas la synthèse des fructosanes ; ces résultats confirment ceux de **WAIN et COLL. (1964)**.

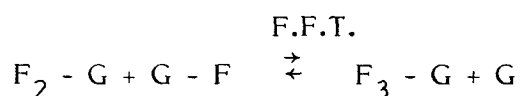
**EDELMAN et JAFFORD (1968)** ont montré que la formation des polymères pendant la croissance des tubercules se faisait selon le schéma représenté dans la FIGURE 3 . Le saccharose est transformé en trisaccharide par le "sucrose-sucro-1 fructosyl transférase". Le fructosyl terminal du trisaccharide est transféré à une molécule de saccharose par le  $\beta$ 2-1 fructan 1-fructosyl transférase, de nouveaux transferts sont ensuite effectués par le même mécanisme. La dépolymérisation survient au démarrage de la phase végétative. Les  $\beta$  (2-1) fructan 1 fructano-hydrolases (inulinases) transforment les polymères en fructose et saccharose (FIGURE 4 ).

Par ailleurs, **SINGH et BAHTIN (1971)** et **SATYANARYANA (1976)** ont montré que la synthèse s'effectuait sous l'action de deux enzymes :

- La saccharose-1-fructosyl transférase (S.F.T.) qui réalise, à partir du saccharose (G-F), la synthèse d'un trisaccharide, le 1 fructosyl saccharose F2-G, considéré comme une plaque tournante du métabolisme des fructosanes S.S.T.



- La  $\beta$  (2 - 1) fructane fructosyl transférase (F.F.T.) qui intervient dans la synthèse des fructosanes de D.P. > 3



Cette synthèse dans les feuilles des différentes espèces de la famille des composées a été démontrée par un apport de saccharose radioactif (**COLLINS et CHANDORKAR, 1973**). Le fructosyl terminal du trisaccharide est transféré à une molécule de saccharose par la  $\beta$  (2 - 1) fructane - fructosyl transférase ; de nouveaux transferts sont ensuite effectués par le même mécanisme.

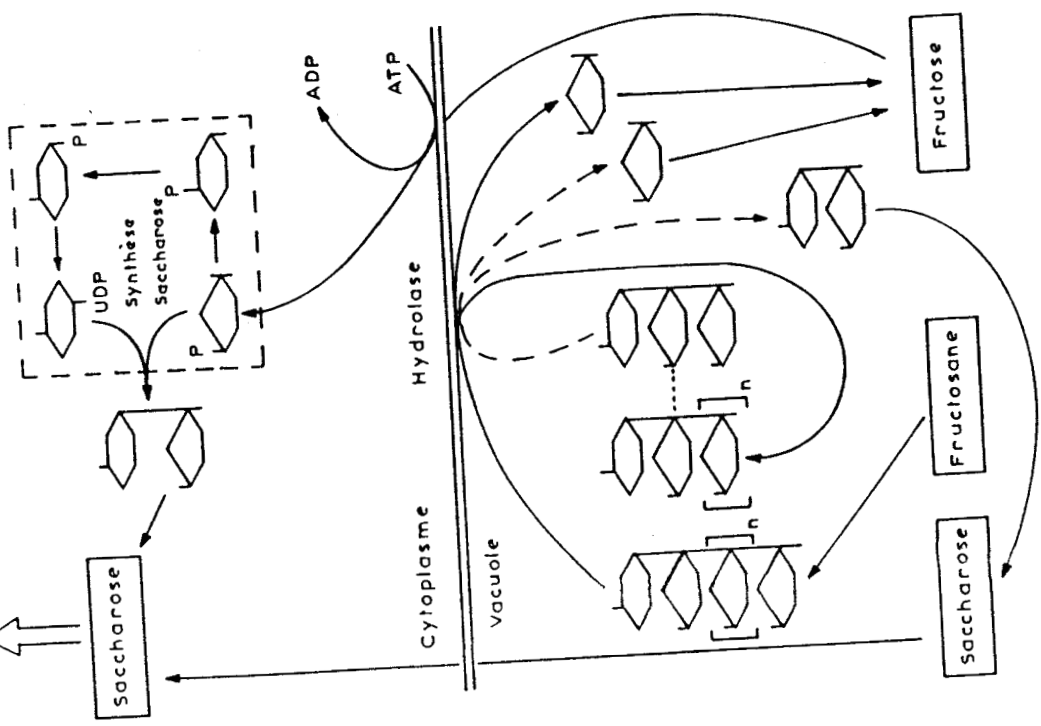


FIGURE 4 : Dépolymérisation de l'inuline en saccharose dans les cellules de tubercules de topinambour. (D'après EDELMAN et JEFFORD, 1968).

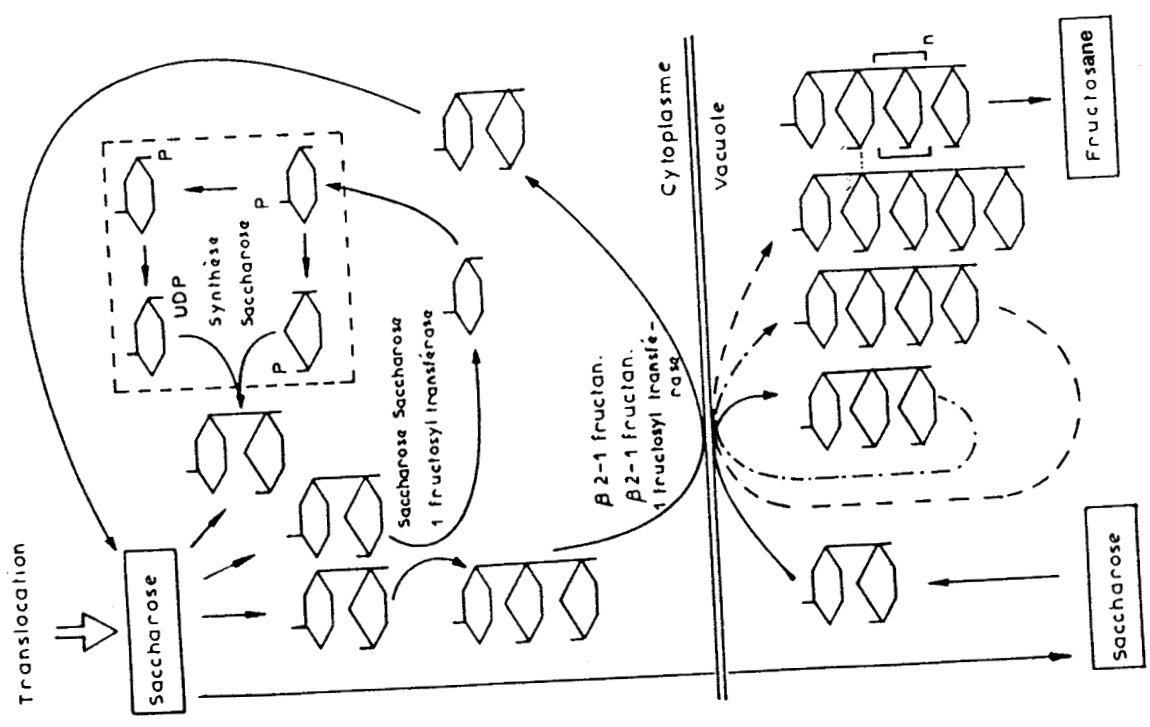


FIGURE 3 : Synthèse de l'inuline dans les cellules de tubercules de topinambour. (D'après EDELMAN et JEFFORD, 1968).





### 5) Etude des propriétés d'un fructosane : l'inuline

Parmi les polyfructosanes d'origine végétale, l'inuline est particulièrement intéressante ; c'est le premier produit de ce type qui a été découvert et le mieux étudié. De plus, c'est un produit abondant que l'on trouve dans des plantes très répandues. Ce fructosane a été isolé par ROSE (1804), à partir du topinambour, puis en 1805 à partir de l'inuline - auré (*Inula hélienium*). Il a été appelé inuline par THOMSON (1811) qui l'a obtenu par précipitation spontanée à froid de la liqueur d'extraction à chaud des tubercules. En 1893, TANRET montre que ce produit est constitué par un mélange de substance qu'il sépare par différence de solubilité "l'inuline" du topinambour en trois fractions qu'il appelle inuline, pseudo-inuline et inulenine. Il a montré également que les tubercules contiennent d'autres fructosanes que le saccharose, qu'il appelle "héliantine" et "synanthrine" ; il les décrit comme des intermédiaires entre l'inuline et le saccharose. Ce même auteur émit également l'hypothèse que l'inuline et ses "dérivées" contiennent des résidus du glucose. La structure de ces composés a été étudiée dès 1928 (HARWORTH et LEARNER, 1928), il a été rapidement démontré que l'inuline (isolée du dahlia) était composée de résidus de D fructose liés en position  $\beta$ 1-2 formant des chaînes d'environ 30 unités (HARWORTH et COLL., 1932) linéaires et contenant des résidus glucose (HIRST et COLL., 1950).

BACON et EDELMAN (1951) ont montré, par ailleurs, que cette classification était artificielle et que les polyfructosanes du topinambour et des autres composées étaient constitués en fait par un mélange plus complexe, séparable par chromatographie, contenant du saccharose et des substrats de plus en plus polymérisés (DEDONDER, 1951).

#### Structure de l'inuline :

L'inuline est composée d'un mélange de polymères dont la formule générale est représentée dans la FIGURE 2 .

Lorsque  $n = 0$ , la formule correspond à celle du saccharose. Il est possible de séparer par chromatographie en couche mince, plusieurs unités distinctes correspondant à différents degrés de polymérisation, à partir de la fraction fructosanique totale de la chicorée (Cf. Chapitre I).

Ces méthodes, comme d'ailleurs les techniques plus sophistiquées telles que la chromatographie en phase gaz, le gel filtration, la chromatogra-

phie liquide à haute performance (H.P.L.C.) ne permettent de séparer facilement que les substances de faibles poids moléculaires. Le degré de polymérisation maximum de l'inuline se situe aux environs de 34 (POLLOCK et COLL., 1979). Il est probable que tous les degrés de polymérisation de  $n = 1$  à  $n = 34$  peuvent être présents dans une fraction fructosanique totale. En fait, les techniques de routine ne permettent de séparer que les 8 à 10 premiers polymères. Selon RUTHERFORD et PHILIPS (1975), cet ensemble correspond à la fraction soluble alors que les polymères de plus hauts poids moléculaires correspondent à la fraction insoluble. Les deux catégories de polymères peuvent être séparées selon leur solubilité dans une solution bouillante d'éthanol à 80 %. La configuration moléculaire de l'inuline a été étudiée par PHELPS (1965) et MIDDLETON (1975). La molécule se présente sous forme d'une hélice de rayon  $10 \text{ \AA}$  et de semi longueur d'onde  $25 \text{ \AA}$  ; chaque tour d'hélice représente environ 4 molécules du fructose.

Les propriétés de l'inuline ont le plus souvent été étudiées sur l'inuline du commerce qui ne contient en fait que les polymères les plus insolubles : -l'inuline cristallise sous forme étoilée, en forme d'aiguilles, lorsque la cristallisation est gênée (HOCHÉ, 1926); - sa rotation spécifique en solution aqueuse  $\alpha_D^{20}$  est comprise entre - 20 et - 40 (MC DONALD, 1946).

PHELPS (1965) a étudié quelques autres paramètres physico-chimiques des solutions d'inuline :

- coefficient de sédimentation :  $S = 1,003 \times 10^3$  (solution à 10 g/l),
- viscosité intrinsèque :  $\frac{\eta}{c} = 0,079 \text{ cm}^3$  (solution à 10 g/l),
- volume spécifique partiel :  $v = 0,0601 \text{ cm}^3/\text{g}$ ,
- pression osmotique :  $5,03 \text{ cm H}_2\text{O}$  (solution à 1 g/l),
- molécule à pouvoir réducteur faible ou nul,
- poids moléculaire :  $\approx 5\ 000$ ,
- la solubilité rapide de l'inuline est pratiquement en dessus de  $40^\circ \text{ C}$ . la solubilité augmente avec la température mieux que le pH diminue.

Si les expériences de solubilisation se prolongent, et surtout en milieu acide, l'hydrolyse chimique favorise artificiellement la solubilité de l'inuline.

## II - ETUDE DES PLANTES RICHES EN POLYFRUCTOSANES

Les plantes de la famille des composées constituent les sources potentielles de polyfructosanes les plus intéressants.

### 1) Le topinambour (*Heliantus tuberosus*)

Le topinambour, originaire de l'Amérique du Nord, peut se cultiver en France ; il présente de bons rendements en hydrates de carbone, n'a que peu d'exigence agronomique particulière. Il peut être cultivé sur sols pauvres, actuellement mal valorisés, et sa production de fane est importante. Il présente dans le contexte français toutes les caractéristiques de ce que l'on pourrait appeler le substrat énergétique.

#### 1.1 - Aspect agronomique

Le composé majoritaire du topinambour est l'inuline : environ 80 % de la matière sèche. La plante produit une partie aérienne très développée (une ou plusieurs tiges suivant la variété et le climat) et une partie souterraine (tubercules). La forme des tubercules change avec la variété et l'état du sol. La couleur de leur peau varie selon la variété : blanche, rose ou violette ; leur poids peut varier de 20 à 200 g. Le topinambour peut se développer sur tout terrain, en particulier sur sols peu profonds ; il s'accommode bien aux différentes textures et aux pH. Les meilleurs rendements sont obtenus cependant sur les terres légères. Il supporte mieux la sécheresse que la betterave et la pomme de terre et craint moins le froid.

L'usage, à grande échelle, du topinambour nécessite cependant de nombreuses études au niveau agricole pour améliorer les conditions de production et l'utilisation du produit (concentration et conditionnement). Les principaux travaux effectués sur le topinambour sont ceux de **BOSWELL et COLL. (1936)**, **BAILLERGE (1942)**, **TSVETOUKHINE (1960)**, **MOULE et COLL. (1967)** et, plus récemment, de **GUIRAUD et COLL. (1981)**.

#### 1.2 - Composition chimique et rendement en inuline

Si la plante entière est intéressante pour son utilisation en tant que fourrage, seuls les tubercules le sont pour la production d'inuline. Le rendement en tubercule est donc à prendre en considération. Divers travaux ont été effectués pour étudier les conditions de culture et de récolte donnant

le meilleur rendement. Celui-ci est obtenu lorsque la plante est arrivée à complète maturité et que les fanes sont sèches, c'est-à-dire à partir de décembre (MOULE et COLL., 1967). Dans les conditions optimales, le rendement en tubercules peut atteindre 50 à 60 tonnes par hectare (BAILLAGE, 1942 ; MARILLER, 1943).

Les tubercules de topinambour contiennent une grande quantité d'inuline, des protéines, de la cellulose, des sels minéraux et différents acides : cheoriogénique, parahydroxybenzoïque, vanillique, gentisique, commarique, caféique et férulique.

GUIRAUD (1981) a repris l'étude de la composition chimique de tubercules de topinambour variété "violet de Rennes", récoltés à la fin de l'hiver (TABLEAU 5 ).

Les valeurs obtenues sont d'ailleurs en accord avec celles données par la littérature pour diverses variétés (BAILLARGE, 1942 ; MOULE et COLL., 1967).

Les sucres totaux du topinambour représentent 78 à 83 % de la matière sèche ou 20 % de la matière humide, ce qui donne une production théorique de 10 à 12 tonnes de sucre/hectare. La teneur en sucres des tubercules et leur nature varient selon la date de récolte et les conditions de stockage (RUTHERFORD et WESTON, 1968 ; DORREL et CHUBEY, 1977). La plus haute teneur en sucre coïncide en général avec le plus haut rendement en tubercules. Les variations en sucre portent aussi sur les degrés de polymérisation, et l'apparition plus ou moins importante des sucres réducteurs (BACON et LOXLEY, 1952). La baisse du degré de polymérisation entraîne une variation du rapport  $\frac{\text{glucose}}{\text{fructose}}$ , ces sucres étant exprimés en valeurs potentielles, déterminées après hydrolyse, et correspondant à la moyenne des rapports afférents de chaque polymère  $\frac{G}{F}$ . Ce rapport varie de 0,15 à 0,38 pour des tubercules à maturité, ce qui indique la présence des quantités importantes de polymères de petites tailles chez le topinambour (HABER et COLL., 1941 ; CHUBEY, 1977). Ces observations sont importantes dans l'optique d'une production de fructose à partir de cette plante par hydrolyse enzymatique.

## 2) Le dahlia

Il s'agit d'une plante d'origine mexicaine, introduite en France vers 1800, et utilisée comme plante ornementale. Elle possède des tubercules

COMPOSANTS	QUANTITE EN % DE LA MATIERE SECHE
Sucres totaux	78 à 83
Matière grasse	0,42 à 0,60
Cellulose	2,8 à 3,9
N. Kjeldahl	1,7 à 2,2
Protéines	6,3 à 8,7
Cendres	4,1 à 8
Phosphore	0,88 à 0,48
Soufre	0,15 à 0,20
Calcium	0,20 à 0,24
$\frac{\text{Matière sèche} \times 100}{\text{matière humide}}$	20,5 à 24

TABLEAU 5 : Composition du topinambour. (D'après GUIRAUD, 1981).



groupés, de formes irrégulières et contenant une quantité importante d'inuline (75 % de la quantité de la matière sèche ou 11,5 % de la matière humide). La richesse particulière en polymères de haut poids moléculaire influe sur le rapport  $\frac{G}{F}$  qui varie de 0,035 à 0,2. Le rendement peut atteindre, selon les variétés, 40 tonnes de tubercules à l'hectare (**HABERT et COLL., 1941**), ce qui représente 4,5 tonnes d'inuline. Cette plante possède de nombreux inconvénients : elle est très sensible aux mauvaises conditions climatiques ; les tubercules sont difficiles à récolter et leur stockage et transport sont rendus malaisés par leur forme irrégulière ; la teneur en eau est relativement élevée des tubercules (85 %) ne favorise pas le bon rendement en sucres. Cependant, cette plante est intéressante pour la production d'inuline de bonne qualité chimique (haute polymérisation) ; elle l'est moins pour des productions de type industriel.

### 3) La chicorée (*Cichorium intybus*)

C'est une culture typique de la région Nord - Pas-de-Calais, qui s'étend sur un peu plus de 5 000 hectares. La production nationale a augmenté de 31 310 tonnes en quatre ans ; la région Nord - Pas-de-Calais produit, à elle seule, 60 % de la production. La chicorée est cultivée dans le monde pour fabriquer des succédanés du café appelés "chicorée" ; les racines, découpées en cossettes, sont séchées (12 % d'eau au maximum) et torréfiées à 140° C pendant deux heures. Durant cette étape, l'inuline est caramélisée et transformée en fructose ; l'intybine, substance amère, se combine à l'inuline pour donner la saveur aromatique particulière de la chicorée (**BLANC, 1978**). Le produit est ensuite refroidi rapidement, puis déshydraté par atomisation. Outre cette utilisation, la chicorée est cultivée pour ses feuilles qui sont consommées en salades, particulièrement sous forme d'endives forcées.

#### 3.1 - Aspect agronomique

La chicorée est plus exigeante que le topinambour. Elle nécessite des sols peu profonds, frais, limoneux, ou sableux à limoneux et suffisamment pourvus en chaux ; les terres lourdes sont déconseillées. Les jeunes plantes sont sensibles au froid pour les premiers stades de croissance, et un climat frais, brumeux, océanique, est favorable. Le semis a lieu fin avril à début mai sur un terrain bien préparé par un labour d'automne et fumé abondamment

par 1 000 et 1 500 kg d'engrais composé, plus 100 à 150 kg de nitrate par hectare. Il s'effectue soit avec des graines enrobées ou nues, à l'aide de semoirs de précision en lignes écartées de 0,40 à 0,45 m à raison de 30 à 35 grains au mètre linéaire. La culture nécessite des binages et désherbages. Lorsque la culture est effectuée pour la racine, la récolte s'effectue fin octobre à l'aide d'un matériel qui assure à la fois le décoltage, l'arrachage et le chargement. Les rendements moyens à l'hectare sont de 35 à 40 tonnes de racines contenant 20 % de matière sèche, et 10 à 12 tonnes de feuilles (MOULE, 1972). Cependant, nous ne retrouvons pas ce poids après forçage car il y a une perte de 5 à 25 % de la matière sèche.

### 3.2 - Technique de forçage de l'endive

La carotte, bien développée, est arrachée, coupée au collet, puis forcée. L'opération de forçage peut être faite de manière traditionnelle : la carotte d'endive est remise en terre, en couloir, recouverte d'un mélange de terre fine et de paille, le tout sous plastique ou tôle ondulée, puis maintenue à une température de 20° C pendant 18 à 21 jours. De nombreuses recherches permirent, dès 1970, une véritable industrialisation du forçage en salle, sans terre de couverture, et notamment en culture hydroponique. Ce dernier procédé, qui s'avère le plus rentable, consiste à ranger les carottes dans des bacs étanches (métalliques ou plastifiés) pour que l'extrémité de la racine baigne dans 4 à 5 cm d'eau ou, mieux, de solution nutritive. Le "chicon" (partie feuillue) se développe ainsi en salle obscure et thermo-régulée. Les "chicons" sont ensuite commercialisés tandis que les "carottes" sont généralement utilisées en alimentation animale ou abandonnées en tas pourrissants à proximité des zones de production, ce qui représente un danger de prolifération d'agent infectieux et notamment le *Sclerotinia sclerotiorum*.

### 3.3 - Composition physico-chimique

Les racines de chicorée possèdent une composition voisine de celles du topinambour.

La composition chimique de la racine d'endive après forçage (TABLEAU 6) (Rapport C.E.R.T.I.A., 1973), nous indique que les teneurs en cellulose et matière azotée totale (M.A.T.) sont faibles, de même que la teneur en minéraux, à l'exception du potassium. En unité fourragère (U.F.), la racine d'endive représente à poids égal, trois fois la valeur de celle de la betterave,

ELEMENTS ORGANIQUES	POUR 100 GRAMMES DE PRODUIT BRUT
Humidité	73,45 g.
Matière sèche	26,55 g.
Azote total	0,168 g.
Protéines totales	1,05 g.
Liquides totaux	0,36 g.
Glucides totaux (exp. en fructose)	21,61 g.
Sucres réducteurs	5,77 g.
Inuline	14,13 g.
Indigestible glucidique	1,17 g.
Cellulose weed	11,00 g.
Matières pectiques	0,12 g.
ELEMENTS MINERAUX	QUANTITE EN MG
Cendre totale à 550° C	820
Calcium	65
Phosphore	48
Sodium	12
Potassium	443
Fer	1
Magnésium	21
Cuivre	0,2
	rapport $\left\{ \begin{array}{l} \text{Ca/P} = \\ 1,35 \\ \text{K/Na} = \\ 35,9 \end{array} \right.$
ACIDE AMINES LIBRES	QUANTITE EN MG
Arginine	66
Cystine	traces
Histidine	5,4
Isoleucine	9,82
Leucine	4,72
Lysine	8,92
Méthionine	traces
Phenyl alanine	9,00
Thionine - serine	75,00
Valine	7,00

**TABEAU 6 : Composition chimique de l'extrait de racine d'endive forcée.**  
(Rapport C.E.R.T.I.A., 1973).



mais elle ne contient pas plus de matière azotée digestible (M.A.D.) ; c'est donc un aliment essentiellement énergétique. La valeur fourragère (V.F.) d'un hectare de racines forcées équivaut à 92 % de celle d'un hectare de betterave. L'apport en protéine des racines d'endive ne représente que 40 % de l'apport des betteraves, l'extractif non azoté (E.N.A.) est essentiellement représenté par l'inuline.

Comme pour le topinambour, la teneur et la nature des sucres varient selon l'époque de la récolte et le stockage (BHATIA et COLL., 1974 ; PHILIPS et RUTHERFORD, 1976).

Le potentiel en glucose et fructose est également étudié, le rapport  $\frac{G}{F}$  varie de 0,1 à 0,35 (HABER et COLL., 1941 ; CHUBEY et DORREL, 1977). Une récolte tardive entraîne une augmentation sensible de ce rapport, comme pour le topinambour.

### 3.4 - Valeur alimentaire des carottes d'endives après forçage

Les carottes d'endives peuvent servir à l'alimentation du bétail, mais leur utilisation doit faire l'objet de quelques précautions, ce qui constitue un frein à leur emploi. En effet, une dose modérée engendre des fermentations au niveau du rumen, de type butyrique, certes favorables à la production laitière, mais pouvant provoquer aussi des troubles (cétose).

A dose excessive, l'inuline favorise l'acidose lactique et l'apparition de troubles digestifs et des complications générales liées à la résorption d'acide lactique et d'histamine. Les propriétés diarrhéiques bien connues de la racine d'endive peuvent être reliées à la présence d'inuline, mais également à la richesse en potassium, en principe amers, et en latex.

### 4) Conservation des racines

L'usage actuellement envisagé pour ces plantes riches en hydrocarbures, et en particulier pour la "chicorée", nécessite encore de nombreuses études au niveau agricole. Les conditions de production, la mécanisation de la culture et tous les aspects liés à l'utilisation des produits, en particulier la conservation et le conditionnement, doivent être améliorées. La conservation des racines hors du sol pose un problème important : celles-ci se flétrissent et pourrissent assez rapidement ; leur utilisation industrielle nécessite des travaux de recherches et la mise au point des techniques de fermentation à partir de ces plantes, nécessite un approvisionnement permanent en matière

première difficilement compatible avec la campagne de production qui s'échelonne souvent de septembre à fin avril. Il faut donc mettre au point des procédés satisfaisants de stockage et de conservation de ces racines. Plusieurs modes de stockage ont déjà été étudiés :

- La conservation est, certes, très efficace mais n'est pas envisageable pour utilisation à grande échelle ;

- La conservation en chambre froide, à + 4° C, présente de bons résultats, même après un séjour de 6 mois, à condition que les racines n'aient pas été lavées au préalable ;

- D'autres modes de conservation, tels que la préparation de jus concentrés ou acidifiés, sont à l'étude à l'**Institut Français du Pétrole (1982)**, en particulier un extrait dont le pH est amené à 1,5. Ces extraits se conservent bien à température ambiante pendant 25 à 30 jours, sans apparition de contamination. L'inuline est alors presque totalement hydrolysée.

Pour une production industrielle, le stockage doit être le plus simple possible, par exemple sous forme de silos sur le champ, et isolés par des couches de terre ou une bache en plastique. Cette méthode de stockage est à l'étude au Centre de l'Energie Solaire (**TORAN-DIAZ, 1983**) ;

- Pour les stockages au laboratoire et dans un but d'utilisation rapide, nous avons broyé les carottes d'endives préalablement lavées (broyeur de végétaux D 38 Black et Decker). La purée obtenue est homogénéisée puis placée au congélateur à - 20° C, en sachets de plastique individuels.

Lors du stockage des racines en chambre froide à + 4° C, nous avons pu observer un ramollissement rendant le broyage difficile, une dépolymérisation des polyfructosanes, une augmentation des sucres réducteurs et notamment le glucose. **RUTHERFORD et WESTON (1968)** avaient déjà décrit ce phénomène.

### 5) Exploitation des plantes riches en polyfructosanes

Si l'exploitation des plantes riches en inuline a beaucoup regressive après la seconde guerre mondiale, la technologie sucrière a bien évolué. L'adaptation des techniques sucrières au topinambour est à l'étude à l'Institut Français du Pétrole et se présente favorablement avec un rendement d'extraction des sucres de 95 %. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont utilisé le jus d'extraction comme milieu de base pour la production d'alcool ou de protéines (**DUVNJAK, 1981 ; GUIRAUD, 1981 ; WILLIAMS, 1982 ; MARGERITIS, 1981**). Mais peu de microorganismes sont capables de convertir directement l'inuline en éthanol ;

une hydrolyse préalable, soit chimique, soit enzymatique, est nécessaire à l'obtention de moûts fermentescibles.

### 5.1 - L'hydrolyse chimique

Déjà des auteurs tels que **KIERTAN (1980)**, **GUIRAUD (1981)** ont tenté d'hydrolyser l'inuline contenue dans des plantes comme le topinambour, ou la chicorée par hydrolyse chimique. Cette hydrolyse se fait à pH acide et à température élevée. Pour une même température, plus le pH est bas, plus l'hydrolyse est rapide : à 85° C, une heure environ à pH 1,5 et 3 heures à pH 3,5 (**FLEMING, 1979**). L'hydrolyse est rarement complète, la liaison terminale glucose - fructose étant particulièrement résistante. Ce procédé engendre souvent des composés indésirables par dégradation des molécules relativement fragiles. **ZITTAN (1981)** a noté l'apparition de 5 % de dianhydride de fructose. La neutralisation des hydrolysats peut s'effectuer à la soude, la potasse, l'ammoniaque, la chaux et le carbonate de calcium.

L'emploi de soude et de potasse entraîne une augmentation de la force ionique qui n'est pas toujours compatible avec une croissance microbienne ultérieure. L'emploi d'ammoniaque est d'un prix prohibitif. La précipitation des complexes de calcium, lorsqu'elle est incomplète, peut gêner la suite des opérations.

En définitif, ces procédés physico-chimiques se sont avérés peu rentables.

### 5.2 - L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique présente une alternative intéressante. Plusieurs  $\beta$  fructofuranosidases capables d'hydrolyser les  $\beta$  fructosanes ont été décrites. Dans le chapitre suivant, nous analyserons les données bibliographiques se rapportant aux différentes  $\beta$  fructofuranosidases rencontrées chez les microorganismes.

### III - ETUDE DES $\beta$ FRUCTOFURANOSIDASES

AVIGAD et BAUER (1966) ont classé les inulinases dans le groupe des fructane-hydrolases qui regroupent les enzymes actives sur les polymères du fructose. Ils distinguent trois catégories, selon la nature de la liaison fructose - fructose hydrolysée.

#### 1) Les enzymes spécifiques de la liaison $\beta$ 2-6

Elles sont appelées levane-hydrolases ou levane-6-fructanohydrolases. Elles hydrolysent les levanes en libérant des oligofructosides de tailles variables et, dans certains cas, du fructose ou du difructose. On rencontre ces enzymes chez de nombreuses bactéries : *Azotobacter*, *Aerobacter levanicum* (HESTRIN et GOLDBLUM, 1953), *Arthrobacter tumescens* (ZELIKSON et HESTRIN, 1961), *Pseudomonas sp.* (AVIGAD et ZELIKSON, 1963). Il est intéressant de noter, comme nous l'avons signalé dans le paragraphe I, que toutes ces bactéries produisent également des levanes. Ces enzymes sont sans action sur le saccharose, le raffinose et l'inuline, bien que, dans certains cas, une légère hydrolyse (3 %) a pu être constatée (ZELIKSON et HESTRIN, 1961).

#### 2) Les enzymes spécifiques de la liaison $\beta$ 1-2

Elles sont appelées inuline-hydrolases ou inuline-1-fructanohydrolase. Il s'agit d'enzymes hydrolysant l'inuline, le raffinose et le saccharose mais n'ayant pas d'action sur les levanes. Elles se rencontrent chez les plantes, les levures et les moisissures.

##### 2.1 - Chez les plantes

Ces types d'enzymes sont présents dans les tubercules de topinambour (EDELMAN et BACON, 1951 ; EDELMAN et JEFFORD, 1964). Ces auteurs ont montré qu'il existait en fait trois types d'enzymes : une invertase, agissant sur le saccharose mais sans action sur l'inuline, et deux inulinases appelées hydrolases A et B (EDELMAN et JEFFORD, 1964). Ces dernières sont pratiquement inactives sur le saccharose, mais hydrolysent l'inuline en libérant du fructose et un résidu non réducteur. Ces enzymes n'agissent pas sur les levanes d'origine bactérienne ( $\beta$ 2-6), ni sur l'irisine  $\beta$ 2-6,  $\beta$ 1-2. Les pH optimaux d'action sont respectivement de 5 et 5,5. Ces deux enzymes sont séparées

facilement par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose. D'autres plantes, riches en inuline, possèdent dans leurs racines un système enzymatique identique, comportant une invertase et deux hydrolases actives sur l'inuline ; c'est le cas du pissenlit (*Taraxacum officinalis*) (RUTHERFORD et BEACON, 1962 a, b) et de la chicorée (*Cichorium intybus*) (FLOOD et COLL., 1970 ; RUTHERFORD et PHILIPS, 1970).

## 2.2 - Chez les moisissures

Des inuline-hydrolases ont été décrites chez les moisissures : *Aspergillus niger* possède une inulinase active sur l'inuline, mais sans action sur le saccharose et le raffinose (NAKUMARA et COLL, 1978 a). Cette enzyme est une endo-enzyme et produit des oligofructosides à partir de l'inuline (inulotriose, inulotetraose, inulopentose), son activité maximale se situe à pH = 5,3 et à 45° C, son Km sur l'inuline est de  $1,25 \cdot 10^{-3}$  M.

Une autre espèce d'*Aspergillus* possède une inulinase, mais qui a un mode d'action totalement différent (NAKAMURA et COLL., 1978 b). Cette enzyme hydrolyse à la fois l'inuline et le saccharose et libère du fructose par l'extrémité de la chaîne en laissant un résidu non réducteur ; son activité maximale se situe à pH = 5 et 55° C ; son Km sur inuline est de  $1,87 \cdot 10^{-3}$  M.

## 2.3 - Chez les levures

De nombreuses levures possèdent des enzymes actives sur l'inuline ; ces enzymes sont en général de  $\beta$ 1-2 fructofuranosidases. Il a été démontré que chez les levures (contrairement à celles des plantes), l'activité sur le saccharose et celle sur l'inuline sont dues à une même enzyme (YURKEVICH et COLL., 1972 ; YURKEVICH et KOVALJOVA, 1972 a ; KOVALJOVA et YURKEVICH, 1973 ; NEGORO et KITO, 1973 a).

### 2.3.1 - Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Elle possède une invertase faiblement active sur inuline et dont le rapport  $\frac{I}{S}$  (inuline/saccharose) est très faible (SNYDER et PHAFF, 1960). Cette enzyme est capable de dégrader les levanes ; son pH optimum se situe pour le saccharose et le raffinose entre 4,5 et 5,5. L'enzyme reste très active à pH acide. Elle existe sous deux formes : intra et extracellulaire (GASCON et COLL., 1968). Elle est partiellement inductible car sa biosynthèse et son

excrétion dans le milieu sont stimulées par la présence de saccharose **FRIIS et OTOLENGHI, 1959**). Des  $\beta$  fructosidases de même type, à faible activité inulinasique, ont été décrites pour d'autres levures : *Saccharomyces paradoxus* (**YURKEVICH et KOVALJOVA, 1972 b**), chez *Candida utilis* (**NEGORO, 1978**).

Par ailleurs, **WILFRED (1974)** a mis en évidence chez *Saccharomyces rouxii*, une  $\beta$  fructofuranosidase cryptique hydrolysant le raffinose et le saccharose, possédant un pH optimum de 5,5 et un Km de 83 mM ; elle ne devient active qu'après un traitement des cellules pendant deux minutes par 0,1 volume d'acétate d'éthyl dans un tampon acétate pH 6.

### 2.3.2 - Chez *Kluyveromyces fragilis*

Des enzymes ont des propriétés très voisines des précédentes, mais leur activité sur inuline est beaucoup plus importante ; leur rapport  $\frac{I}{S}$  est très élevé. Cette caractéristique peut justifier leur appellation "inulinase", mais il est difficile de les classer en E.C. : 3.2.1.26 (invertase) ou en enzyme E.C. 3.2.1.7 (inulinase) et vice-versa. La  $\beta$  fructofuranosidase de ce type la mieux connue et la mieux étudiée est celle de *Kluyveromyces fragilis* (**SNYDER et PHAFF, 1960, 1962 ; YURKEVICH et KOVALJOVA, 1972 a ; NAHM et BYUN, 1977 ; NEGORO, 1978 ; GROOTWASSINK et FLEMING, 1980 ; HEWITT et GROOTWASSINK, 1984**). Il s'agit d'une enzyme inductible par l'inuline et à moindre degré par d'autres  $\beta$  fructosides, facilement excrétée dans le milieu de culture, mais également présente dans la cellule ; les enzymes extra et intracellulaires ont les mêmes propriétés. Les caractéristiques décrites varient légèrement selon les auteurs. **SNYDER et PHAFF (1960)** et **YURKEVICH et KOVALJOVA (1972 a)** ont montré que l'activité maximale sur inuline est à pH 5 et celle du saccharose à pH 4. **NAHM et BYUN (1977)** signalent les activités respectivement à pH 5,5 et 3, alors que **NEGORO (1978)** indique que le pH optimal est identique pour les deux substrats à pH 4,5 et à 55° C. D'après **NEGORO**, l'enzyme est stable à 55°C, mais dénaturée rapidement à 60° C, sans différence notable selon le substrat. Par contre, **NAHM et BYUN (1977)** signalent une perte notable d'activité à 55° C. Ces auteurs ont déterminé les Km : le Km inuline est de  $8 \cdot 10^{-3}$  M et celui du saccharose est de  $6,7 \cdot 10^{-3}$  M. Cette enzyme agit en libérant du fructose libre à partir de l'inuline en laissant un résidu non réducteur. Le glucose n'est libéré que lorsque toute la molécule de l'inuline est dégradée. **SNYDER et PHAFF (1962)** ont montré qu'il s'agit d'un mécanisme préférentiellement "single chaîne". Plusieurs auteurs considèrent que cette enzyme possède toutes les caractéristiques favorables pour une application industrielle (**GROOTWASSINK, 1982 ; HEWITT and GROOTWASSINK, 1984**).

### 2.3.3 - Chez les autres levures

#### - *Kluyveromyces lactis* :

**YURKEVICH et COLL. (1972)** ont montré que cette levure possédant une  $\beta$  fructosidase unique active sur l'inuline et sur le saccharose. Le site actif est le même pour les deux substrats (**KOULJOUA et YURKEVICH, 1973**). Les pH optimaux sur l'inuline et le saccharose sont respectivement de 4,1 et 3,3.

#### - *Kluyveromyces marxianus* :

Elle possède une inulinase fortement induite par l'inuline, mais aussi par le saccharose, le fructose et le glucose. Selon **SARAD PAREKH et MARGARITIS (1985)**, *K. marxianus* produit dans les conditions de culture une quantité beaucoup plus importante d'enzyme que *K. fragilis*.

#### - *Candida kefyr* :

Il s'agit également d'une enzyme inductible existant sous forme extra et intra cellulaire et excrétée facilement dans le milieu de culture (**NEGORO et KITO, 1973 b**). Les enzymes extra et intra cellulaires ont des propriétés similaires (**NEGORO et KITO, 1973 b**). Le pH optimal d'activité se situe à 4,5 et la température optimale à 50° C, l'enzyme est relativement stable à 55° C.

#### - *Candida salmenticensis* et *Debaryomyces phaffii* :

Isolés en 1980, 1981 par **GUIRAUD et COLL.**, elles possèdent un système enzymatique actif sur l'inuline, le saccharose et le raffinose. Inductibles, comme celle de *K. fragilis*, Par la présence d'inuline, aucune activité enzymatique n'est pourtant décelable après culture sur glucose, bien qu'il n'existe pas d'effet glucose. L'activité inulinasique de deux souches dépend d'une seule enzyme pour les trois substrats. La température d'activité varie entre 45° C et 50° C avec un pH optimal de 4, et le rapport  $\frac{I}{S}$  est de 0,11.

#### - *Pichia polymorpha* :

Elle possède deux enzymes distinctes (**CHAUTARD et COLL., 1981**). Ces auteurs ont observé, en étudiant l'effet du pH, qu'il y avait deux activités maximales respectivement à pH 2 - 2,5 et pH 4 - 5,5. La séparation chromatographique (D.E.A.E. cellulose) a permis d'ailleurs de mettre en évidence effectivement deux types d'enzymes qu'ils ont appelées E1 et E2.

Les propriétés de E1 sont les suivantes : pH 2,5, température maximale de 45° C, Km sur inuline =  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M.

Les propriétés de E2 sont : pH optimale 4,5 - 5, température optimale de 45° C, avec un Km sur inuline de  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M.

Ici, contrairement aux inulinases, la stabilité de l'enzyme E2 conservée à + 4° C ou par congélation à - 18° C est faible (une semaine).

### 3) $\beta$ fructosidasiques non spécifiques

Il s'agit d'enzymes actives à la fois sur inuline ( $\beta$ 1-2) et les levanes ( $\beta$ 2-6). De telles enzymes ont été décrites chez les levures (SNYDER et PHAFF, 1960) et chez les moisissures. *Penicillium* possède en fait trois enzymes extracellulaires qui hydrolysent l'inuline, le saccharose et les levanes en libérant du fructose (NAKUMARA et COLL., 1977). Ces enzymes sont séparables sur D.E.A.E. cellulose ou sephadex ; leurs pH optimaux sont respectivement de 4, 4,5 et 5 et leur  $K_m$  :  $1,73 \cdot 10^{-4}$  M,  $2,33 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,57 \cdot 10^{-4}$  sur inuline.

Des microorganismes du rumen possèdent également une activité fructane hydrolase (THOMAS, 1960). Les protozoaires ciliés holotriches ont une activité de type "exo" et dégradent l'inuline et les levanes en donnant du fructose (PUNJ et COLL., 1970).

### 4) La $\beta$ fructofuranosidase chez les bactéries

L'étude détaillée des inulinases ( $\beta$ 1-2 fructosidase) bactériennes n'a pas été très développée dans la littérature, à l'exception des travaux entrepris par TANAKA et COLL. (1972). Ces derniers ont isolé un *Arthrobacter* possédant une inulinase, libérant du difructose anhydre à partir de l'inuline ; ils l'ont nommée inulinase secondaire. Cette enzyme a une activité maximale à pH 6 et à 50° C (UCHIMAYAMA et COLL., 1973). Elle est active sur les oligofructosanes ayant au moins deux résidus fructose et non sur le saccharose, le raffinose et les levanes. TANAKA et COLL. (1981) ont pu mettre en évidence une activité sur les levanes, en libérant là aussi un difructose anhydre. Par ailleurs, NAKAYAMA et COLL. (1983) ont montré que la même bactérie possédait une inuline fructotransférase.

Plusieurs autres bactéries possédant des levanes-hydrolases spécifiques de la liaison  $\beta$ 2-6 ont été décrites : *Azotobacter*, *Aerobacter levanicum* (HESTRIN et COLDBLUM, 1953), *Pseudomonas* (AVIGAD et ZELIKSON, 1963), *Actinomyces viscosus* (MILLER et SOMERS, 1978), *Bacillus polymixa* (FUCHS, 1959), *Streptococcus* sp. (DACOSTA et GIBBON, 1968), *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus mutans* (WALKER et COLL., 1983) possèdent selon ces auteurs probablement un exolevanase ayant une légère action sur l'inuline.

### Conclusion

Plusieurs enzymes capables d'hydrolyser les liaisons  $\beta$  fructosides ont été décrites chez les microorganismes (moisissures, levures) et chez les plantes.



S'il est possible de mettre à part les levanes hydrolases, la distinction des inulines hydrolases et des  $\beta$  fructosidases non spécifiques est très artificielle. On trouve en effet de nombreux types d'enzymes pouvant dégrader l'inuline et il est difficile d'en établir une classification. Toutefois, les  $\beta$  fructosidases actives sur l'inuline et les invertases ont des propriétés voisines.

#### IV - ETUDE DE LA REGULATION DU SYSTEME ENZYMATIQUE EXTRACELLULAIRE

##### 1) Effet glucose

Plusieurs travaux, notamment ceux de **HARDER (1979)** portant sur les mécanismes de la biosynthèse des enzymes extracellulaires, ont montré que le glucose jouait un rôle régulateur important. Ce phénomène a été largement étudié chez les bactéries productrices d' $\alpha$ -amylase et de  $\beta$ -glucosidase extracellulaire (**WALKER, 1963 ; COLMAN, 1967 ; MEERS, 1972 ; NARISAMA, 1974**). Ainsi, **COLMAN** a remarqué que la biosynthèse de l' $\alpha$ -amylase extracellulaire de *Bacillus subtilis* est maximale vers la fin de la phase exponentielle et la phase stationnaire, ce qui a permis à d'autres auteurs **SCHAEFFER, 1969 ; MEERS, 1972**) de conclure que cette enzyme était effectivement sous la dépendance du glucose, du fait que l'enzyme n'apparaît dans le milieu qu'après utilisation complète du glucose libéré dans le milieu de culture.

Une autre étude récente de **MOHINDERGIT (1984)** sur la  $\beta$  glucosidase extracellulaire de *Trichoderma harzianum* montre que là aussi la répression de l'enzyme extracellulaire en présence du glucose dans le milieu existe et ce n'est qu'après utilisation complète du glucose que la synthèse et la libération de l'enzyme sont de nouveau observées. Il apparaît que ce phénomène d'effet glucose sur la production de l'enzyme désigne le mécanisme selon lequel le glucose inhibe l'entrée de substrats complexes (polymères) dont l'utilisation nécessite la synthèse d'enzyme inductible, ou entraîne leur sortie du cytoplasme. D'autres auteurs suggèrent que l'effet glucose est un phénomène selon lequel le glucose inhibe immédiatement, mais transitoirement, la synthèse de l'enzyme quand il est additionné à une culture utilisant un substrat complexe qui est consommé plus lentement.

##### 2) Rôle de l'A.M.P. cyclique

D'autres travaux, effectués récemment, ont permis de définir le mécanisme de la répression catabolique dépendante de l'AMPc (**ELOROZA, 1977 ; BOSTFORD, 1981**). Il apparaît que les substrats rapidement métabolisables provoquent la diminution de l'AMPc intracellulaire, ce qui entraîne une inhibition de l'expression de certains gènes inductibles ou constitutifs, cette inhibition est levée par addition de l'AMPc qui, en s'associant avec "cyclic AMP receptor protein ou C.R.P.", agit au niveau de l'ADN en facilitant la

fixation de l'ARN polymérase et, de ce fait, la transcription. Cependant, ce phénomène a été contesté par ULLMANN (1985) qui montre que l'AMPc n'est pas le seul modulateur, le taux intracellulaire de ce nucléotide est plutôt la conséquence et non la cause de la répression catabolique, et l'expression des gènes est régulée soit négativement par des catabolites, soit positivement par le complexe AMPc - C.P.R.

Les inulinases qui ont été étudiées sont fortement induites par l'inuline et à moindre degré par d'autres  $\beta$  fructosides alors qu'après culture sur glucose la teneur en enzyme est très faible et il n'y a pratiquement jamais d'enzyme dans le milieu de culture. Rappelons que la synthèse de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* est réprimée par le glucose (GASSON et OTTOLENGHI, 1972 ; EL ORZA et COLL., 1977) ; des résultats similaires ont été observés chez les levures productrices d'inulinase notamment chez *K. fragilis* (SNYDER et PHAFF, 1960 ; GROOT WASSINK, 1980). Chez *Candida kefyr* (NEGORO et KITO, 1973 a) et chez *Pichia polymorpha* (BAJON, 1983).

Le substrat de croissance semble avoir une influence sur l'excrétion et l'inuline étant le stimulant de l'excrétion le plus actif et là aussi le glucose réprime complètement la biosynthèse de l'enzyme. Ce type de régulation paraît fréquent chez les enzymes extracellulaires (HARDER, 1979).

### 3) Amélioration de la production de l'enzyme

De nombreux travaux portent actuellement sur l'amélioration et le rendement de la production par voie génétique.

La mutagenèse devrait permettre l'obtention des mutants constitutifs, de telle sorte que la culture des microorganismes producteurs puisse se faire sans inducteur, ou bien la synthèse de l'enzyme ne soit pas réprimée. De plus, les mutants résistants à la répression catabolique peuvent parfois produire des quantités importantes d'enzymes ; ils sont intéressants dans la mesure où ils peuvent être cultivés dans des milieux complexes dans lesquels la source de carbone est bon marché. Un tel mutant a été obtenu chez *Saccharomyces cerevisiae* par LAMPEN et NEUMAN (1967), il produit près de 2 % de ses protéines sous forme d'invertase.

## B U T   D U   T R A V A I L

Le but de ce travail est d'étudier la possibilité de produire du fructose en valorisant certaines productions agricoles telles que les endives, culture typique de la région Nord -Pas-de-Calais. En effet, cette plante contient des réserves intéressantes de polymères de fructose : l'inuline et ses dérivés. Actuellement les possibilités d'utilisation sont variées :

- Production de sirop à haute teneur en fructose : l'inuline est un polymère du fructose et constitue une source potentielle de ce sucre. Il existe un marché important pour des sirops à haute teneur en fructose obtenu par conversion de l'amidon de maïs qui s'effectue par l'intermédiaire de trois types d'enzymes : l'amylase, la glucoamylase et la glucoisomérase.

- Utilisation en tant que source de carbone en fermentation pour la production de protéines par culture des microorganismes, en particulier les levures, sur des extraits riches en polyfructosanes, et la production d'alcool qui actuellement est un des produits énergétiques préconisés pour remplacer, au moins partiellement, les carburants.

La production du fructose paraît la plus intéressante. Plusieurs auteurs ont travaillé sur ce sujet et ont présenté divers moyens pour produire du fructose à partir de l'inuline par hydrolyse acide ; d'autres auteurs ont étudié des inulinases d'origine fongique et de levures. Ces enzymes sont généralement endocellulaires, difficiles à obtenir ; il faut un traitement préalable des cellules qui les contiennent avant de les extraire.

Au niveau industriel, les enzymes habituellement utilisées sont des enzymes exocellulaires. Notre tâche consistait à trouver des bactéries aptes à produire des enzymes extracellulaires, capables d'hydrolyser ces polyfructosanes.

Dans la première partie de notre travail, qui consiste à l'obtention d'une  $\beta$  fructofuranosidase, il a été nécessaire d'approfondir la mise au point d'une méthode de screening, des conditions de culture des microorganismes producteurs, des études des différents paramètres physico-chimiques influençant l'apparition de l'activité enzymatique et d'une méthode de purification grossière.

Dans une deuxième partie, l'obtention d'une enzyme purifiée était indispensable, d'une part pour approfondir la connaissance de ses propriétés catalytiques et, d'autre part, pour permettre l'étude de la relation existant entre la structure de la protéine et l'activité enzymatique. Nous avons donc fractionné nos extraits enzymatiques jusqu'à l'obtention d'une préparation ne contenant qu'un seul type de protéine suivant plusieurs critères (homogénéité par chromatographie sur colonne, sur H.P.L.C., électrophorèse, etc...). Ce résultat nous a permis d'entreprendre l'analyse qualitative de la protéine (composition en acides aminés et en sucres) et ensuite le problème de la détermination des groupes impliqués dans l'activité enzymatique. Nous avons pu ainsi entrevoir l'importance des groupes carboxyl, imidazole, thiols.

Ensuite, dans une troisième partie, une étude portant sur la régulation de la biosynthèse de l'enzyme a montré que le glucose inhibait fortement cette biosynthèse.

Dans un objectif d'optimiser la production de l'enzyme, il nous a semblé justifié d'améliorer la résistance de la bactérie à cet effet glucose. La mutagénèse nous a permis l'obtention d'un mutant plus résistant que la souche sauvage.

Enfin, dans une quatrième partie, nous avons abordé la possibilité de production de fructose à partir de polyfructosanes de hauts poids moléculaires (l'inuline commerciale) et à partir de l'extrait d'endive riche en oligo et polyfructosanes par hydrolyse enzymatique.

Les données bibliographiques relatives à ces différents problèmes seront abordées dans les chapitres correspondants.

Une partie des résultats a déjà fait l'objet de deux communications et un article est en cours de rédaction.

MATERIEL et METHODES

—oOo—

## 1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Parmi une centaine de souches bactériennes, nous avons sélectionné une souche I.A.A.L. - E.M. 278 (U.S.T.L. Flandres Artois) et qui semblait avoir une activité  $\beta$  fructofuranosidique importante.

Les souches sont conservées soit sur milieu liquide glucosé à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence de glycérol à 20 % comme antigél pour garder la culture à l'état liquide, soit dans un milieu solide : tryptone caséine soja ou par lyophilisation.

## 2. MATERIEL VEGETAL

Nous avons utilisé des carottes d'endive (*Cichorium intybus*), variété Zoom, avant et après forçage. Dans la mesure du possible, les carottes ont été utilisées fraîches mais, dans certains cas, leur conservation a été obtenue par réfrigération à  $+4^{\circ}\text{C}$  (moins de 10 jours) ou par congélation en sachets plastique, après leur broyage.

## 3. MILIEUX DE CULTURE

### 3.1 - Milieu synthétique non tamponné

$\text{NaNO}_3$ .....	2 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	0,5 g
$\text{CaCl}_2$ .....	0,1 g
$\text{MgSO}_4$ .....	0,5 g
$\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	trace
Eau distillée q.s.p. 1 l	pH 7
pH ajusté par une solution soude ( $\text{NaOH}$ 2N)	

### 3.2 - Milieu synthétique tamponné

$\text{NH}_4 \text{H}_2\text{PO}_4$ .....	8 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{PO}_4$ .....	4 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,5 g
$\text{CaCl}_2$ .....	0,5 g
$\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	trace
Eau distillée q.s.p. 1 l	
pH 7	

### 3.3 - Milieu de culture riche

Peptone.....	5 g
Extrait de levure.....	1 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,5 g
NaNO <sub>3</sub> .....	2,0 g
FeCl <sub>2</sub> .....	trace
Eau distillée q.s.p. 1 l	
pH 7	

### 3.4 - Milieus gélosés

- Les milieux gélosés ont la même composition avec addition de 15 g.l<sup>-1</sup> d'agar agar (Difco)

- Gélose blanche : elle renferme 7,5 g de bacto-agar (Difco) par litre d'eau.

### 3.5 - Milieu de conservation et entretien des souches bactériennes

#### 3.5.1 - Milieu solide

Peptone de caséine .....	15 g
Peptone de soja.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar-agar .....	15 g
Eau distillée q.s.p. 1 l	
pH final 7,3 à 25° C	

#### 3.5.2 - Milieu liquide

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3 g
Citrate de Na.....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Eau distillée q.s.p. 1 l	
Glycérol .....	20 %

Tous les milieux sont stérilisés à 120° C pendant 20 mn. La source de carbone est additionnée à la concentration finale correspondante sous forme de solution stérilisée à 105° C pendant 30 mn.



### 3.6 - Solutions diverses

- Sérum physiologique

NaCl ..... 9 g

Eau distillée q.s.p. 1 l

pH 7

- Tampon phosphate

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ..... 0,2 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ..... 0,2 M

Tampon citrate phosphate

Citrate de sodium ..... 0,1 M

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 0,1 M

Tampon tris malique

Solution tris ..... 0,5 M

Acide malique ..... 0,5 M

## 4. PROCÉDES DE CULTURES DES BACTÉRIES

Nos études de croissance des différentes souches sur les milieux retenus ont été, dans un premier temps, réalisées en tubes, en flacons sous agitation ; nous avons eu ensuite la possibilité d'utiliser un biophotomètre original ; les cultures ont enfin été entreprises en fermenteur de laboratoire.

### 4.1 - Cultures en tubes

Elles ont toutes été réalisées dans des tubes de 20 x 220 ml contenant chacun 8 ml ; chaque tube est inoculé par 0,1 ml d'une suspension contenant  $10^9$  bactéries/ml. Les cultures sont maintenues à 30° C, en agitation rotatoire continue. L'utilisation de la table d'agitation (105 rotations/mn) permet d'obtenir une aération convenable du milieu. La croissance est contrôlée par des mesures régulières de l'absorbance à 600 nm.

### 4.2 - Cultures en flacons

La grande majorité des cultures a été aussi réalisée en flacons de 500 ml ; ces flacons ne contiennent que 100 ml de milieu, sontensemencés avec 1 ml de suspension bactérienne.

Les cultures sont maintenues à 30° C sous agitation rotative, identique à celle utilisée pour les cultures en tubes.

Un prélèvement de 5 ml est effectué régulièrement pour apprécier d'une part l'absorbance à 600 nm et le nombre de cellules viables et, d'autre part, ces prélèvements seront centrifugés et stockés à - 20° C pour les dosages des sucres et l'étude de l'apparition de l'activité enzymatique.

#### **4.3 - Culture en biophotomètre**

Certaines cultures comparatives sont réalisées dans des tubes qui sont placés dans un appareil, le biophotomètre (MARAIS et COLL., 1981). Celui-ci permet le suivi de la croissance par la mesure automatique de la densité optique (D.O.) dans des conditions précises d'agitation et de température. Les cultures sont réalisées en incubant 10 ml de milieu synthétique à 30° C, l'agitation est de type "Vortex" de 500 r.p.m.. La D.O. est mesurée automatiquement à 700 nm toutes les 15 mn ; les substrats sont ajoutés à des concentrations variables.

#### **4.4 - Culture en fermenteur**

Nous avons constaté qu'au cours des cultures en tubes et en fioles, la croissance et l'apparition d'activité enzymatique sont limitées ; en effet, dans ces conditions de cultures, les cellules sont dans un état physiologique mauvais. Pour cette raison, mais également afin de pouvoir contrôler certains paramètres de cultures, on a réalisé des cultures bactériennes en fermenteur.

##### **4.4.1 - Description du matériel**

Nous avons utilisé le petit fermenteur "Setric" ayant un volume utile de 3 l (FIGURE 5 ). Il est constitué d'une cuve de 3 l coiffée d'une platine où sont fixés les capteurs suivants :

- une électrode du pH,
- une sonde de température,
- un déclin de mousse,
- une sonde d'oxygène dissous.

L'appareil est muni d'une régulation de température et de pH et d'un enregistrement sur papier de l'évolution de l'oxygène dissous et du pH. L'aération s'effectue par injection d'air à une pression d'un bar ; le pH est régulé par des solutions concentrées de  $H_3PO_4$  (2N) et NaOH (2N).

Les prélèvements s'effectuent par une ponction à la seringue, à travers un tuyau de caoutchouc dur, une pompe péristaltique assurant un débit continu à travers le conduit.

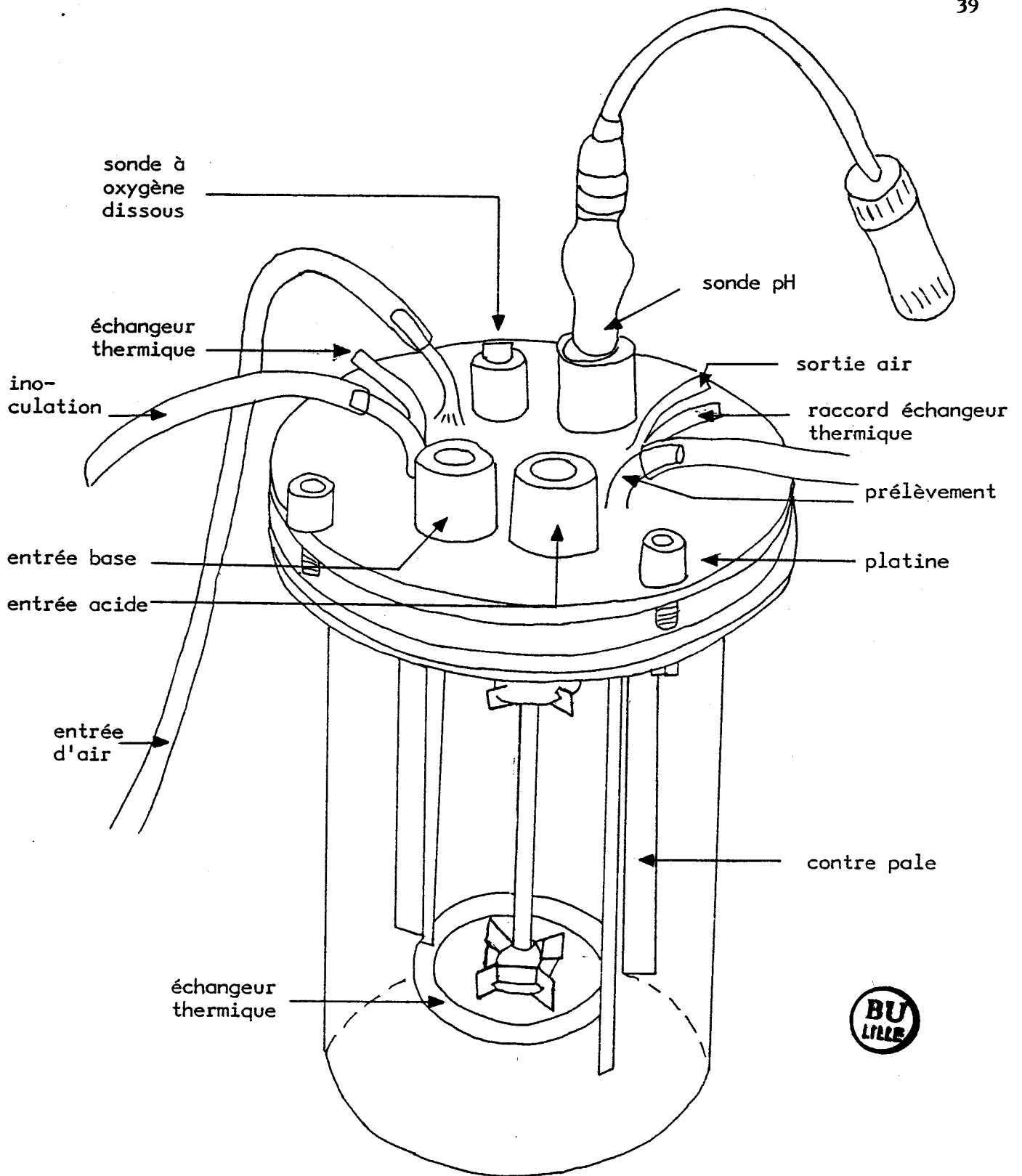


Figure 5 : Le fermenteur.

#### 4.4.2 - Conduite de la fermentation

##### a) Préparation

Trois litres du milieu sans inuline sont préparés ; 2 700 ml sont induits dans la cuve de fermenteur ; 300 ml dans une fiole d'incubation de 500 ml. La stérilisation est assurée par autoclavage à 120° C pendant 1 heure. Les solutions sucrées préparées et stérilisées séparément sont introduites dans la fiole et dans le fermenteur juste avant l'inoculation.

##### b) Préculture

Elle s'effectue en fiole de 500 ml, qui contient 300 ml du milieu, ensemencé avec 5 ml de suspension bactérienne. Le flacon ainsi inoculé est mis à incuber sur agitateur rotatif à 105 tours/mn pendant 24 heures.

##### c) Inoculation du fermenteur

Le milieu préchauffé à 30° C est inoculé aseptiquement avec la préculture qui représente 10 % du volume total. Nous avons effectué la numération des bactéries par dilution sur gélose nutritive, le nombre de bactéries au temps  $t = 0$  est sensiblement égal à  $10^8$ /ml.

##### d) Déroulement et surveillance de la fermentation

5 à 10 ml de culture sont prélevés aseptiquement à intervalle de temps régulier, pour :

- la vérification de la pureté de l'inoculum,
- la mesure de l'absorbance à 600 nm,
- la vérification du pH,
- la détermination du nombre de cellules viables/ml,
- la détermination du temps de génération,
- la consommation d'oxygène au cours de la croissance,
- la centrifugation pour dosage du sucre,
- l'évolution de l'apparition de l'activité enzymatique.

#### 5. MUTAGENESE CHIMIQUE

On utilise le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (N.T.G.) à la concentration de 740 µg/ml dans le tampon tris malique :

Acide malique 0,1 M .....	5 ml
Tris (hydroxyméthyl-amino-méthane) 0,1M	9 ML
Eau distillée q.s.p. 1 l	

L'agent mutagène est dissous dans le tampon phosphate par agitation, 2 heures à 37° C. Le culot de centrifugation de la culture bactérienne est lavé et remis en suspension dans 10 ml de tampon tris-maléique auxquels on ajoute le même volume de solution de N.T.G. ; on laisse agir l'agent mutagène 30 mn à 30° C en agitation, puis on centrifuge, on lave et on reprend les cellules dans du tampon phosphate. Les germes viables sont dénombrés avant et après action de la N.T.G.

## 6. TECHNIQUE ENZYMATIQUE

### 6.1 - Purification d'enzyme

#### 6.1.1 - Dialyse

Les préparations enzymatiques ont été dialysées contre de l'eau ou du tampon phosphate 0,01 M à pH 6, à l'aide de bodin de dialyse généralement pendant une nuit.

#### 6.1.2 - Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium constitue une force ionique élevée, capable de précipiter les protéines, donc de les concentrer et éliminer la plupart des petites molécules contaminantes (SCOPES, 1973). A cette fin, le sulfate d'ammonium a été utilisé suivant le monogramme de DIXON (1953) qui donne la quantité de sulfate solide à ajouter pour amener les extraits bruts au pourcentage de concentration désirée. Les extraits sont soumis à une précipitation fractionnée par palier de concentration de 10 % jusqu'à 90 % de saturation. Les précipitations s'effectuent pendant 30 mn pendant une nuit à + 4° C sous agitation magnétique douce. Les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation à 12 000 g pendant 25 mn. Le culot est remis en suspension par un volume minimum de tampon phosphate à pH 6. Le sulfate d'ammonium restant dans l'extrait protéique est éliminé par dialyse sur bodin de dialyse contre l'eau pendant une nuit.

#### 6.1.3 - Filtration moléculaire

Le principe de la filtration sur gel est basé sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont donc éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

### a) Gel de Sephadex G25

Le sulfate d'ammonium restant dans l'extrait protéique est éliminé aussi par filtration moléculaire sur gel de Sephadex G25 (Pharmatra Fine Chimicale) équilibré dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 6.

Le gel de Sephadex est un gel de dextrane modifié, dont les macromolécules réticulées forment un réseau tridimensionnel. Les petites granules de Séphadex gonflent dans l'eau et se transforment en gel ( $V_g$  : volume propre de la matière de gel ;  $V_i$  : volume intérieur en gel). La phase aqueuse extérieure au gel est appelée eau interstitielle ( $V_0$  : volume mort). Une colonne de gel est caractérisée par les paramètres qui obéissent à la relation :  $V_t = V_g + V_i$ . Les molécules dont la taille est supérieure à celle des mailles de réseau circulent entre les sphères du gel et sortent de la colonne avec le front du tampon d'éluion. Les petites molécules pénètrent dans les pores, diffusent à travers les mailles et s'éluent plus tardivement.

La limite inférieure d'exclusion se situe à une taille de 5 000. Dans la pratique, la valeur  $V_0$  est déterminée par une solution de bleu de dextran 0,1 %. Pour éviter toute perte de protéines enzymatiques, le volume recueilli après le  $V_0$  et de celui déposé dans la colonne.

Les activités globales sont déterminées à ce stade de purification.

### b) Gel de filtration "Ultrogel ACA 34"

L'ultrogel est formé de petites sphères de polyacrylamide agarose réticulé de 60 à 100  $\mu$  de diamètre. L'ultrogel LKB ACA 34 a été choisi car sa zone de fractionnement (20 000 - 400 000) convient à l'enzyme étudiée.

Le gel, préalablement dégazé à la trompe à eau, est versé dans une colonne de verre, puis équilibré dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 6. Le niveau du gel dans la colonne est rapidement stabilisé et le débit est maintenu à 30 ml/h à l'aide d'une pompe péristaltique. Le volume du gel est de l'ordre de 900 gels (1 m de hauteur et 2 cm de large). Nous avons déterminé les caractéristiques de la colonne :  $V_0 = 35$  ;  $V_i = 68$  ml ;  $V_e$  de l'enzyme = 69 ;  $V_{Kd} = 0,5$ .

#### 6.1.4 - Chromatographie sur D.E.A.E. cellulose

Principe : Sur la cellulose utilisée comme support sont fixés les groupes diéthyl-amino-éthyl (D.E.A.E.) chargés positivement aux valeurs de pH utilisé, sur milieu faiblement alcalin, des liaisons électrostatiques s'établissent entre les charges négatives des protéines et les groupements ammonium quaternaire de l'absorbant. Les protéines qui diffèrent par le nombre de leur charge ou leur densité de charge seront séparées lors de l'élution par un gradient de force ionique croissante.

Préparation de la colonne : Nous avons utilisé une colonne de 30 cm de hauteur et de 2,5 cm de large, garnie de D.E.A.E. cellulose Wathman équilibré par tampon phosphate 0,01 M, pH 7,5 (hauteur du gel : 15 cm). L'équilibration est réalisée par passage de ce tampon pendant plusieurs heures. L'extrait protéique en solution dans le même tampon est déposé au sommet du support chromatographique. Les substances non fixées sont éliminées par rinçage à l'aide du même tampon, puis les protéines sont éluées par un gradient linéaire de force ionique croissante en NaCl de 0 à 0,5 M. Le débit est maintenu à 26 ml/h à l'aide d'une pompe péristatique et l'effluent est collecté par fractions grâce au collecteur.

#### 6.1.5 - Chromatographie d'affinité

La concanaviline A (Con A) se combine à des molécules qui comportent des résidus  $\alpha$ -D manopyranosyl et  $\alpha$ -D glycopyranosyl. La con A sepharose 4B contenait 8 mg environ de lectine couplé par 1 ml de gel et donc absorbant spécifique de polysaccharide, des glycoprotéines et des glycolipides. La capacité de la con A - sépharose B est donnée par environ 8,5 mg de thyroglobuline (P.M. : 670 000) par ml de gel ; l'élution s'effectue avec tampon acétate 0,05 M à pH 6 contenant  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$  à 1 mM et NaCl 0,15 M. Le décrochage s'effectue avec le même tampon auquel on ajoute une concentration de 0,3 M en  $\alpha$ -D méthyl glucoside. Une colonne de 5 ml de con A sépharose 4B a été utilisée, stabilisée dans le tampon d'élution dégazée.

#### 6.1.6 - Electrophorèse sur gel de polysaccharide

Avec cette technique, les macromolécules sont soumises simultanément à une filtration moléculaire et à une migration dans un champ électrique. La technique employée est celle de **DAVIS (1964)**.

- Les gels utilisés ont la composition de 7,5 % dans des tubes de 0,5 cm et de 7 cm de longueur.

- L'ampérage, qui est un facteur limitant, a été fixé à 4 mA/tubes.

- Le tampon d'électrophorèse utilisé est un tampon tris-glycine pH 8,3 (tris 0,5 mM, glycine 128 mM). On a ajouté le glycérol à l'extrait afin d'augmenter sa densité et du bleu de bromophénol pour marquer le front de migration.

- Révélation des protéines : pour détecter les protéines, les gels sont colorés en les introduisant dans une solution de bleu de coomassie (coomassie brillant bleu R. sigma) :

Coomassie bleu R. ....	275 mg
Acide acétique.....	10 ml
Méthanol.....	50 ml
Eau distillée q.s.p. l l	

La décoloration est poursuivie jusqu'à ce que les bandes bleues de protéines apparaissent.

### 6.1.7 - Détermination de la masse moléculaire

#### a) Par filtration moléculaire sur sépharose 6B

Le gel (Pharmacia Fine Chemical) est introduit dans une colonne (diamètre 2,5 cm ; hauteur 70 cm), puis équilibré par un tampon phosphate 0,05 M, pH 6. Un ml de solution contenant 1 mg de chaque protéine "témoin" est déposé au sommet de la colonne. L'élution est assurée par une pompe péristaltique qui montrent un débit de 15 ml/h. La densité optique à 205 nm de chaque fraction est mesurée. Pratiquement, on procède d'abord au calibrage de la colonne à l'aide de protéines témoins, puis on introduit la protéine enzymatique recherchée dont on repère sa position par son activité. La masse moléculaire sera évaluée par référence à la courbe d'étalonnage (FIGURE 6 ).

#### b) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à différentes concentrations

Des électrophorèses d'une enzyme purifiée sont réalisées sur des gels à différentes concentrations en polyacrylamide selon le procédé classique, en maintenant toutefois le rapport acrylamide sur méthylène bisacrylamide (égal à 30) pour un gel à 7 %, contient 28 g d'acrylamide et 32 g de bisacrylamide.

Lorsque l'on exprime le log du R.F. en fonction de la concentration du gel, on obtient une droite dont la pente permet de déterminer



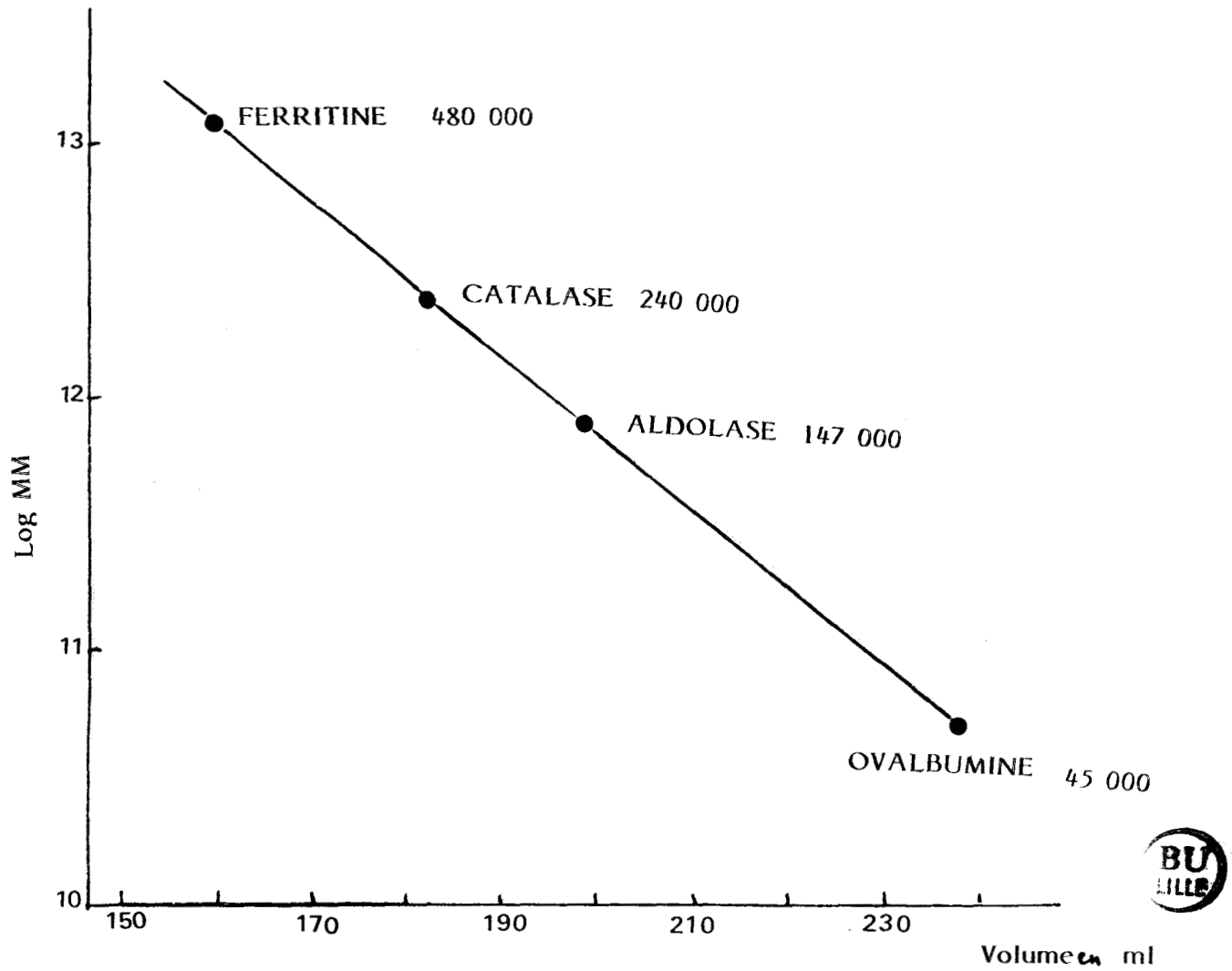


FIGURE 6 : Courbe d'étalonnage pour la détermination des masses moléculaires par filtration sur colonne de sephadex 6B.

la masse moléculaire par référence à la courbe d'étalonnage tracée par HEDRICK et SMITH (1968). A titre de vérification de la méthode, deux témoins ont été réalisés en présence de catalases (240 000) et de ferritine (480 000) (FIGURE 7 ).

#### 6.1.8 - Détermination de la masse moléculaire des sous-unités

La détermination est également faite sur un produit de gel acrylamide en plaque (P.A.A. 4 / 30 pharmacia) ; l'échantillon, ainsi que les protéines marqueurs, sont dissous dans le tampon suivant :

Tris .....	0,01 M
E.D.T.A.....	0,001 M
S.D.S. ....	2,5 %
Mercaptoéthanol.....	5 %
pH 8	

Le mélange est chauffé 10 mn au bain marie à 100° C ; l'étalonnage de la plaque est effectué avec les protéines "marqueurs" suivantes : sérum albumine bovine (67 000) ; ovalbumine (43 000) ; anhydride carbonique (30 000) ;  $\alpha$ -lacta-albumine (144 000) (FIGURE 8 ).

Le tampon d'électrophorèse utilisé est le suivant :

Tris .....	0,04 M
Acétate de Na .....	0,02 M
E.D.T.A. ....	0,002 M
Sodium dodecylsulfate.....	0,2 %
pH 8,8	

Les plaques sont prééquilibrées pendant 1 heure à 70 volts, sans échantillon, puis le matériel additionné du bleu de bromophénol et de glycérol est déposé ; environ 3  $\mu$ g de chaque protéine "marqueur" sont déposés (3  $\mu$ l).

L'électrophorèse est réalisée à 150 V (voltage constant) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne l'extrémité du gel, puis est encore poursuivie une heure après que le traceur ait migré hors du gel.

La position de sous-unité est révélée par le bleu de coomassie.

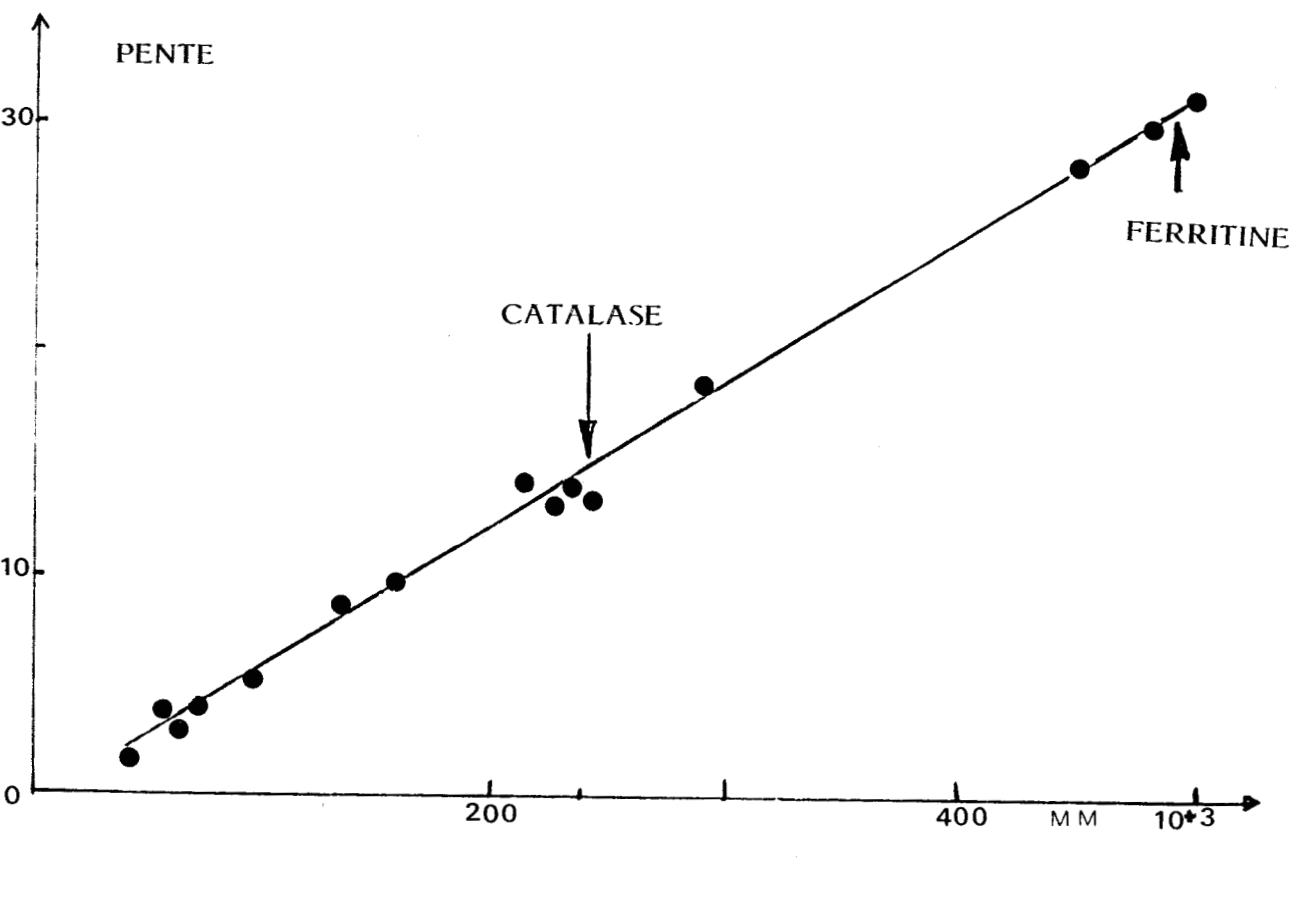


FIGURE 7 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de la masse moléculaire après électrophorèse sur gels de polyacrylamide à différentes concentrations.

Cette courbe est tracée d'après les résultats de HEDRICK et SMITH (1968).

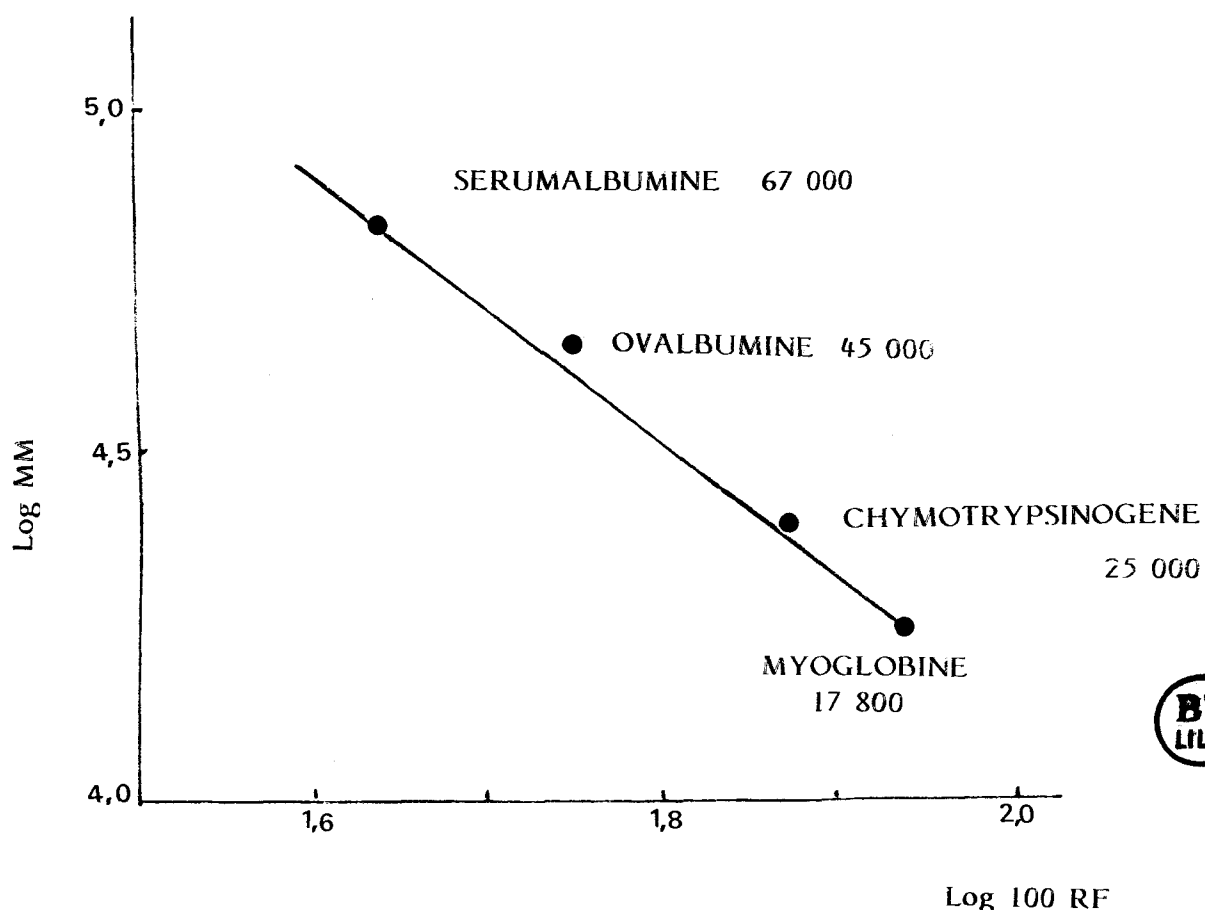


FIGURE 8 : Exemple de courbe d'étalonnage pour la détermination des masses moléculaires des sous unités.

Les électrophorèses sont réalisées sur les gels de polyacrylamides contenant du S.D.S. 0,1 %.

## 6.2 - Dosages enzymatiques

L'activité enzymatique a été mesurée par détermination de l'apparition des sucres réducteurs par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (**BERNFIELD, 1955**).

Le milieu réactionnel contient 0,5 ml des substrats (inuline à 2,5 % saccharose 3 %, raffinose 3 %), 0,2 ml de tampon phosphate à pH 6 et 0,5 ml de solution enzymatique.

La réaction est déclenchée selon les cas par l'addition de l'enzyme ou du substrat est arrêtée par l'addition de réactifs D.N.S. ou par 2 mn d'ébullition.

Afin de pouvoir comparer valablement l'activité sur différents substrats, nous avons, après détermination de la vitesse initiale de la réaction, effectué, dans les conditions citées plus haut, estimé le  $V_m$  par extrapolation.

Nous avons utilisé la formule suivante :

$$V_m = V \left( \frac{K_m}{S} + 1 \right)$$

Le  $K_m$  est déterminé par la méthode de **LI NEWEAVER** et **BURK (1934)**.

Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1  $\mu$ M de fructose/mn à la température et au pH optima de l'enzyme.

## 7. TECHNIQUES ANALYTIQUES

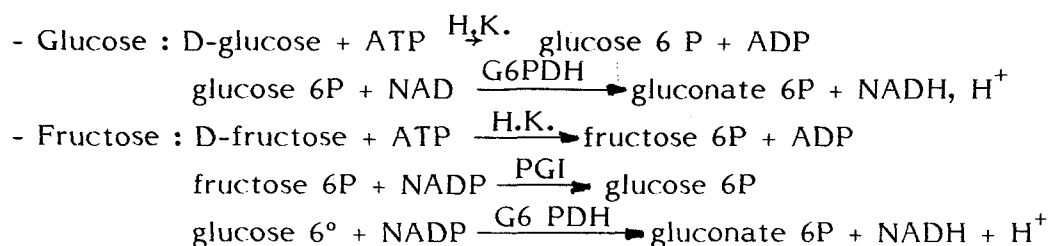
### 7.1 - Dosage des sucres

#### 7.1.1 - Méthode colorimétrique

. Sucres totaux : ils sont dosés par la méthode de l'authrone (**SATTLER, 1948**). Cete méthode fait intervenir une hydrolyse en milieu sulfurique ce qui permet la prise en sucres polymérisés (**TREVELYAN et HARRISSON, 1956**). Une gamme étalon était réalisé avec des concentrations de 0 à 100  $\mu$ g de fructose/ml.

. Sucres réducteurs : ils sont dosés par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (**BERNFIED, 1955**). La valeur de la densité optique à 540 nm, à une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions avec une solution de fructose, permet de déterminer la teneur en sucres réducteurs de l'échantillon.

. Dosage spécifique du glucose et du fructose : ce dosage est réalisé avec le kit enzymatique Boheringer (**BERMEYER, 1974**) selon le protocole préconisé :



L'apparition du NADH est mesurée 340 nm.

### 7.1.2 - Chromatographie des fructosides

#### a) chromatographie sur gel de filtration

- Sur gel sephadex G25 : elle a été effectuée à l'aide d'une colonne de 1 cm de diamètre, de 50 cm de hauteur, garnie de gel de sephadex G25 Pharmacia ; l'élution de l'échantillon est réalisée par l'eau, des fractions de 1 ml ont été recueillies.

- Sur Biogel P-2 : nous avons utilisé le Biogel P-2 (BioRad) dont la zone de fractionnement couvre la gamme des masses moléculaires allant de 100 à 1 800 daltons, et qui convient bien pour la séparation des oligofructosanes. Le D.P. est compris entre 1 et 12. Ce gel peut en outre être utilisé sous des pressions faibles et peut être aussi employé avec la plupart des solvants habituels. D'autre part, la résolution des oligosides est améliorée considérablement quand la température s'élève. La séparation sur ce gel est suivie par une détection en réfractométrie.

#### b) chromatographie sur couche mince

Les extraits sont ensuite chromatographiés sur couche mince en gel de selice (20 cm x 20 ; 0,2 mm d'épaisseur). Le solvant d'élution est constitué par un mélange isopropanol : acétone - acide lactique 1 M (4:4:2) préparé au moins une heure avant utilisation ; la détection des taches est faite en utilisant d'abord l'acide thiobarbiturique qui est un révélateur spécifique des

cétoses et ensuite le naphthoresorcinol qui fait apparaître les autres glucides en donnant une coloration rouge pourpre très contrastée.

### c) Chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.)

Elle a été effectuée à l'aide d'un appareil L.K.B. qui se compose :

- d'une pompe à double piston à pression constante,
- d'un réfractomètre différentiel (type 21 - 42),
- d'un enregistreur sur papier avec ou sans intégrateur,
- d'une colonne water Q<sub>155</sub> CA.

Caractéristiques de la colonne utilisée : C'est une chromatographie liquide-liquide s'effectuant avec une colonne d'échange d'ions de type cationique chauffée à 85° C par de l'eau circulant autour de la colonne.

. Solvant : solution d'acétate de calcium dans l'eau, à raison de 100 mg/l (dégagé à l'hélium).

. Débit : 0,5 ml/mn.

. Pression : 27

. Conservation à l'azide de sodium à 100 mg/l.

Les dosages sont effectués par réfractométrie.

## 7.2 - Dosage des protéines

### 7.2.1 - Technique de LOWRY et COLL. (1951)

Principe : A pH 10, les acides aminés aromatiques réduisent la réaction de Folin ciocalteu. L'intensité de la coloration bleue est augmentée en présence d'ions Cu<sup>++</sup>. La quantité de protéine est déterminée par référence à une courbe étalon établie avec du sérum albumine de boeuf (S.A.B.) pour des concentrations comprises entre 10 et 100 µg/ml (FIGURE 9 ).

Protocole expérimental : A 1 ml de solution protéique, on ajoute 5 ml d'une solution préparée extemporainement composée de 50 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2 % dans de la soude 0,1 N et de 1 ml d'un réactif contenant du CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O à 0,05 % dans une solution de tartrate double de K et Na à 1 % ; 10 mn plus tard, on ajoute 500 µl de réactif de Folin en agitant vigoureusement. Au bout de 10 mn, on procède à la lecture de la D.O. à 750 contre un blanc sans protéine traité dans les mêmes conditions. Certains tampons comme le tris interfèrent avec les réactifs (REJ et RICHARD, 1974).

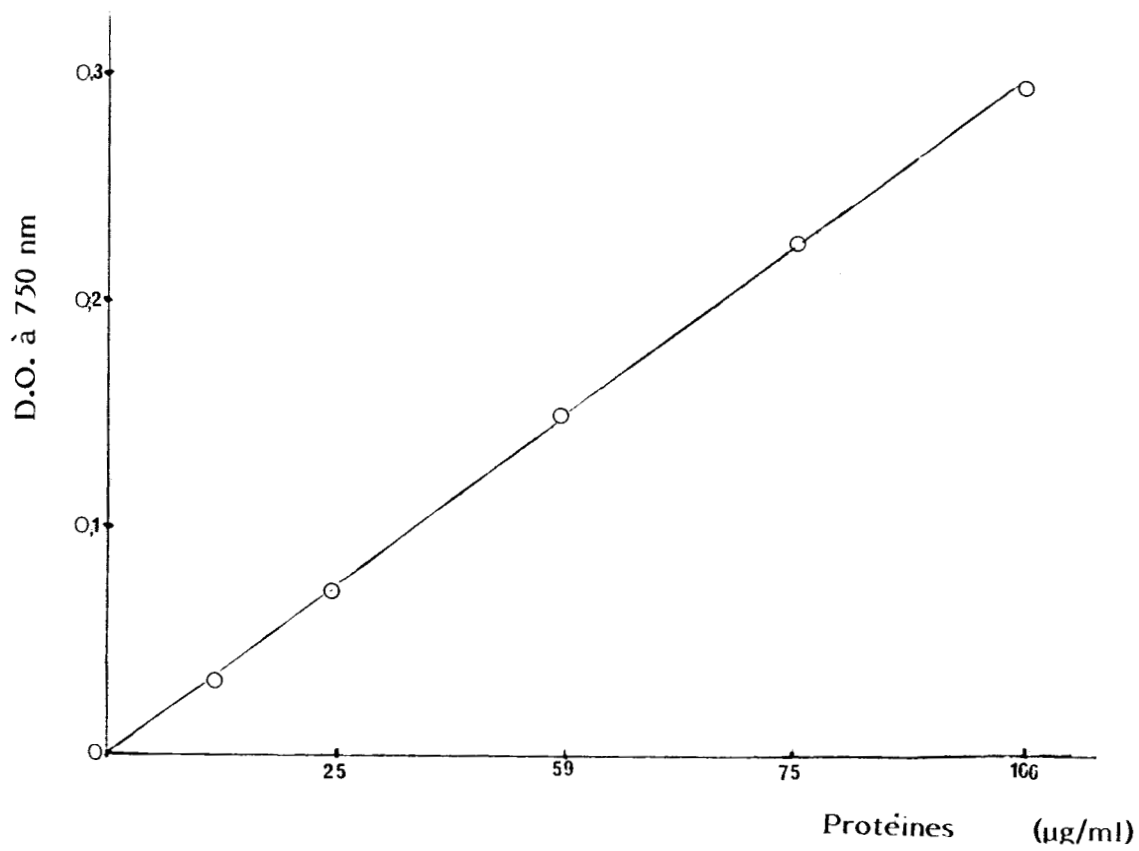


FIGURE 9 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.



### 7.2.2 - Méthode de SCOPES (1974)

L'absorption due à la liaison peptidique est mesurée à 205 nm. La concentration en protéine est donnée par la formule :

$$C \text{ mg/ml} = \frac{\text{D.O. 205}}{\epsilon \text{ 205}}$$

Les acides aminés aromatiques absorbant légèrement à cette longueur d'onde, il s'avère nécessaire de corriger le coefficient d'absorption spécifique :

$$\epsilon \text{ 205} = 27 + 120 \frac{\text{D.O. 280}}{\text{D.O. 205}}$$

La valeur moyenne de ce coefficient déterminée par SCOPES est de 31 ; elle est augmentée par la présence de composé phénolique ou d'acide nucléique.

### 7.2.3 - Dosage par la méthode de BRADFORD (1976)

Cette méthode utilise la propriété que possèdent les solutions en milieu acide de bleu brillant de coomassie de voir leur absorbance maximale de 465 à 595 nm quand il y a formation de complexes avec les protéines.

Nous avons utilisé le réactif commercialisé : la BioRad qu'on dilue au 1/5e.

A 0,1 ml de solution à doser (contenant 1 à 20 µg), on ajoute 1,9 de réactif sous agitation au vortex. Au bout de 4 mn, on procède à la lecture de la D.O. à 595 nm. La présence de NaOH à une concentration supérieure à 0,1 N ou de S.D.S. à concentrations supérieures à 0,05 %, sont contre-indiquées dans cette méthode.

La comparaison des teneurs en protéines estimées par les trois méthodes pour un nombre élevé d'extraits, montre que les trois techniques donnent des résultats voisins.

Nous avons utilisé de préférence la méthode de SCOPES, en raison de sa rapidité, de sa fiabilité et surtout : sa sensibilité ; en effet, sur des protéines très purifiées (gel de filtration), la technique de LOWRY ne peut pas les doser.

## 7.3 - Antibiotiques

Afin d'éviter les contaminations microbiennes, toutes les réactions enzymatiques ont été réalisées en présence de chloramphenicol (chloromycitine) à la concentration finale de 170 µg/ml.

#### 7.4 - Matière sèche

Les poids de matière sèche ont été mesurés après dessiccation à 108° C pendant 24 heures.

### 8. EXTRACTION DES GLUCIDES

#### 8.1 - Extraction pour analyses

Les composés glucidiques de la racine de la chicorée sont constitués des sucres simples glucose et fructose (D.P. = 1), saccharose (D.P. = 2), d'oligofructosane (dont le D.P. varie de 3 à 8), des fructosanes plus polymérisés (dont le D.P. varie de 8 à 35) et de polyfructosanes de masse moléculaire encore plus élevée. La valeur de D.P. séparant les oligofructosanes de D.P. varie de 3 à 8 et de polyfructosanes supérieurs à D.P. 8 est arbitraire et résulte des méthodes d'extraction. Il est évident que ces composés de D.P. plus ou moins élevés ne peuvent être extraits par solvant unique et il se pose un problème au sujet de leur extraction. Habituellement, on se sert des solutions ethanoliques à 90 % ou à 80 % pour obtenir les sucres simples et les oligofructosanes de D.P. < 8 et on utilise des solutions éthanoliques à 50 % et des solutions aqueuses pour dissoudre les fructosanes dont le D.P. dépasse 8 (FIALA et JOLEVET, 1980).

Pour les analyses et les dosages simples, nous avons préféré extraire les glucides à température ambiante en utilisant des solutions alcoolique et aqueuse, ce qui représente une méthode reproductible et permet d'extraire et de séparer, de doser et identifier convenablement les composés glucidiques.

#### 8.2 - Extraction à chaud par diffusion

L'extraction hydroalcoolique montre que l'obtention des sucres de la chicorée est aisée ; mais il est évident que cette méthode d'extraction n'est pas adaptée à une exploitation à grand volume (jus de fermentation, production des sucres, etc...), coûteuse et onéreuse.

L'extraction a été réalisée d'un broyat des racines de chicorée ; ce broyage donne une pâte suffisamment aqueuse pour permettre une bonne extraction ; nous l'avons donc réalisée en ajoutant de l'eau, de manière à obtenir des suspensions plus fluides, sans toutefois aboutir à une grande dilution car cela entrainerait ensuite l'obtention de solutions trop faibles en sucres, l'objectif fixé était d'attendre une concentration élevée en sucre ; ce mode

de préparation est le suivant : les racines (carottes) soigneusement lavées, découpées et broyées, une quantité connue de ce broyat (500 à 600 g) dont la teneur en matière sèche est soigneusement mesurée et complétée à 1 l à l'aide d'eau distillée ; l'extraction est réalisée par pression manuelle et filtration du broyat dans des enveloppes et de la gaze.

L'emploi d'eau très chaude à 80° C ou d'eau bouillante permet de dissoudre les polyfructosanes de masse moléculaire très élevée.

### **8.3 - Technique de décoloration de jus obtenus**

Nous avons utilisé du charbon actif NORIT S.A.3 pour décolorer et éliminer d'autres substances contenues dans les carottes d'endives après hydrolyse enzymatique ; c'est une méthode également utilisée en huilerie. Après centrifugation du liquide obtenu, le surnageant est mis en contact pendant 10 à 15 mn à 50° C avec le charbon actif. Ensuite, celui-ci est éliminé par centrifugation à 12 000 g durant 15 mn, puis filtré sur papier plissé. La décoloration est suivie par une prise de densité optique au spectrophotomètre à 420 nm contre l'eau.

### **8.4 - Hydrolyse acide**

On ajuste le pH à 2 par addition d'acide orthophosphorique concentré, puis on porte le jus à 100° C le temps nécessaire à l'hydrolyse. On ramène le pH à 5 par addition d'ammoniac concentré ; on filtre sous vide pour éliminer les précipités formés.

R E S U L T A T S

- 0 0 0 -

## CHAPITRE I

Etude qualitative et quantitative des glucides

de la racine de chicorée

— o o o —

## 1. ANALYSES QUALITATIVES

### 1.1 - Chromatographie de perméation

La séparation des fructosanes et des glucides simples peut s'effectuer par précipitation dans un mélange éthanol - eau de proportions différentes (**GROTELUESCHEN et SMITH, 1968**). Elle peut aussi être obtenue par précipitation différentielle au froid ; c'est ainsi que **EDELMAN et DICKERSON (1966)** ont réussi à séparer les fructosanes des glucides simples par précipitation à l'éthanol à 95 % (V/V) suivie d'une centrifugation à 10 000 g ; mais ces méthodes sont peu précises et fastidieuses. Nous avons préféré utiliser les méthodes chromatographiques sur gel. La méthode que nous avons employée est soit celle proposée par **PONTIS (1968)** pour la séparation des séries homologues des oligomères de fructose, soit celle utilisée par **TRAENEL (1968)**, puis par **DARBYSHIRE et HENRY (1968)**. Le choix du support a été décidé après étude préliminaire sur différents gels disponibles au laboratoire. Le G25 et Biogel P2 ont été retenus car ils possèdent une zone de fractionnement qui couvre les masses moléculaires allant de 100 à 1 800 et conviennent bien pour la séparation des oligofructosanes de degré de polymérisation (D.P.) compris entre 1 et 9. Le gel P2 peut être aussi utilisé sous pression faible et peut être employé avec la plupart des solvants habituels. D'autre part, la résolution des oligosides est améliorée lorsque la température est élevée. La séparation sur ce gel est suivie d'une détection en réfractométrie sur chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.).

#### 1.1.1 - Etalonnage des colonnes

Les colonnes ont été étalonnées en utilisant un mélange glucidique contenant 2 mg/ml de différents composés suivants : D-fructose, D-glucose, saccharose, raffinose et inuline. Les résultats obtenus sont résumés dans le TABLEAU 7 et la FIGURE 10 .

#### 1.1.2 - Analyse d'un extrait végétal : détermination de la répartition des fructosanes et des glucides simples

La description d'une analyse d'un extrait hydro-alcoolique à 85 % de la racine de chicorée montre que la chromatographie sur biogel P2 permet

COMPOSES	DEGRE DE POLYMERISATION	TEMPS DE RETENTION (en mn)
Inuline	≈ 35	12
Raffinose	3	27
Saccharose	2	30
Glucose	1	33
Fructose	1	37

TABLEAU 7 : Séparation d'un mélange standard sur colonne biogel P2 : paramètre d'élution pour un débit de 0,5 ml/mn et une pression de 27 bars.



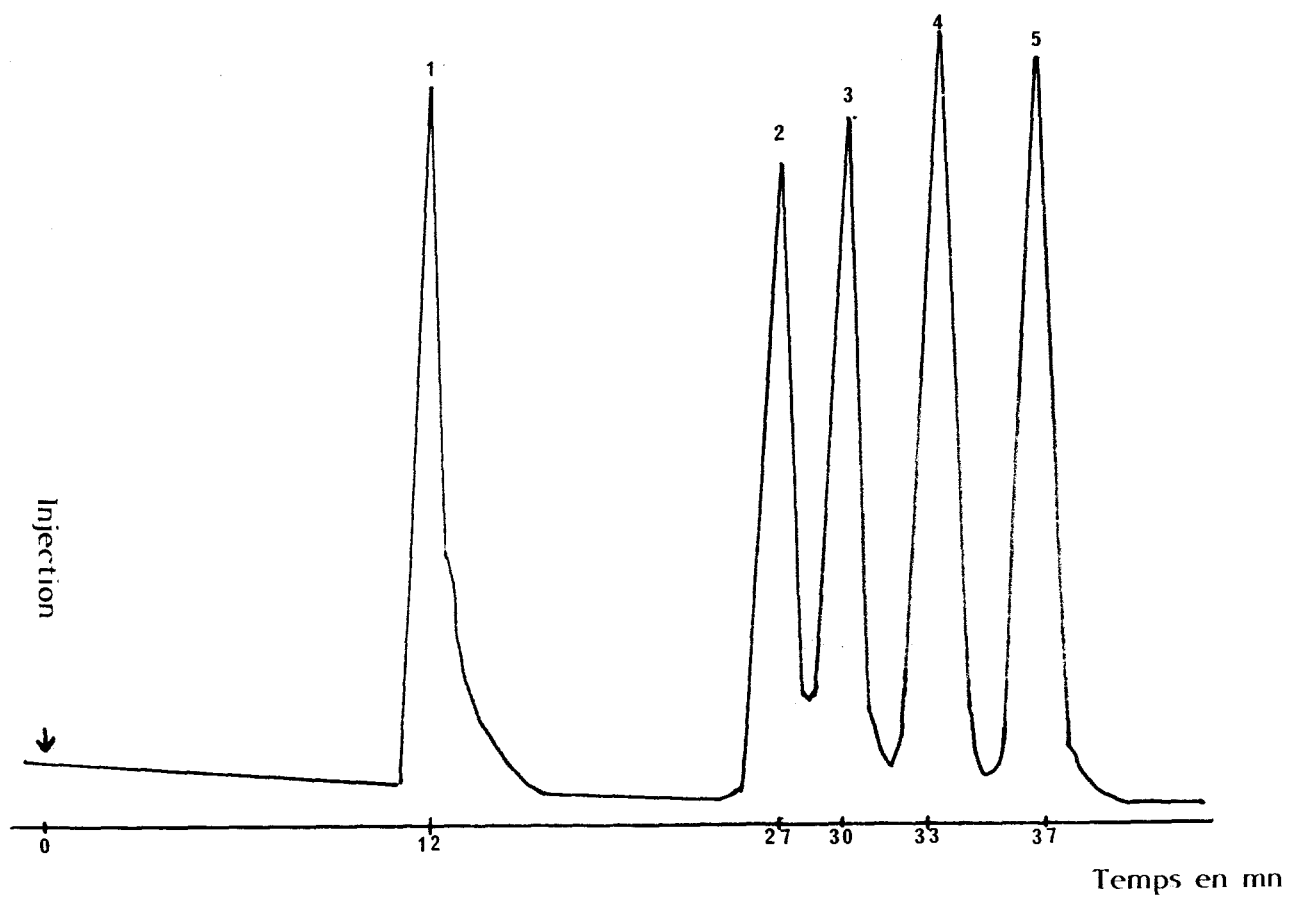


FIGURE 10 : Séparation d'un mélange standard sur colonne biogel P2 suivie d'une détection au réfractomètre.

- 1 - Inuline
- 2 - Raffinose
- 3 - Saccharose
- 4 - Glucose
- 5 - Fructose





une bonne séparation des oligofructosanes de D.P. compris entre 1 et 8 tandis que l'ensemble des fructosanes dont le D.P. est plus élevé dépasse la limite d'exclusion et de ce fait est élevé en un seul pic (FIGURE 11).

Une chromatographie sur gel sephadex G25 permet de voir la répartition des masses moléculaires de ces sucres, le fructose et l'inuline servant de références (FIGURE 12).

On peut constater que la totalité des oses (glucose, fructose, saccharose) et la majorité des oligofructosanes D.P.  $\leq 8$  sont facilement extraits en présence d'éthanol à 85 %. La partie restante des fructosanes plus polymérisés est extraite uniquement par l'eau. A partir de ces résultats d'extraction et de fractionnement de fructosanes et des glucides simples, nous avons simplifié la méthode d'extraction en préparant seulement deux extraits :

- une première extraction est effectuée par l'éthanol à 85 % (extrait hydroalcoolique) ;
- une deuxième par l'eau (solution aqueuse).

La fraction éthanolique contient les oses et les oligofructosanes de D.P.  $\leq 8$  et l'extrait aqueux renferme les fructosanes de D.P.  $> 9$ .

### 1.2 - Chromatographie sur couche mince

Parallèlement à la chromatographie sur gel, nous avons utilisé la méthode de chromatographie sur couche mince pour séparer les oligofructosanes selon leur degré de polymérisation. Cette technique qualitative est plus rapide que la chromatographie sur papier (BHATIA et COLL., 1974). Elle a déjà été employée pour la séparation des oligomères du glucose (HANSEN, 1974, 1975 ; KANAYA, 1978). Ainsi (RUTHERFORD et PHILIPS, 1975) ont réussi à séparer les oligofructosanes de racine de chicorée sur plaque de cellulose jusqu'à D.P. = 5, ce qui est toutefois insuffisant. Nous avons utilisé la méthode de HANSEN (1974) améliorée par FIALA (1980) pour obtenir une bonne séparation des oligofructosanes directement sur un extrait hydroalcoolique. Une séparation d'une série d'oligofructosanes obtenus à partir d'un extrait hydroalcoolique de chicorée est représentée par la FIGURE 13.

Après séparation des oligofructosanes par gel de filtration, chaque pic chromatographique peut être recueilli séparément, puis soumis à une séparation chromatographique sur plaque de selice. La FIGURE 14 représente la répartition des tâches correspondantes aux pics d'élution obtenus après chromatographie sur gel.

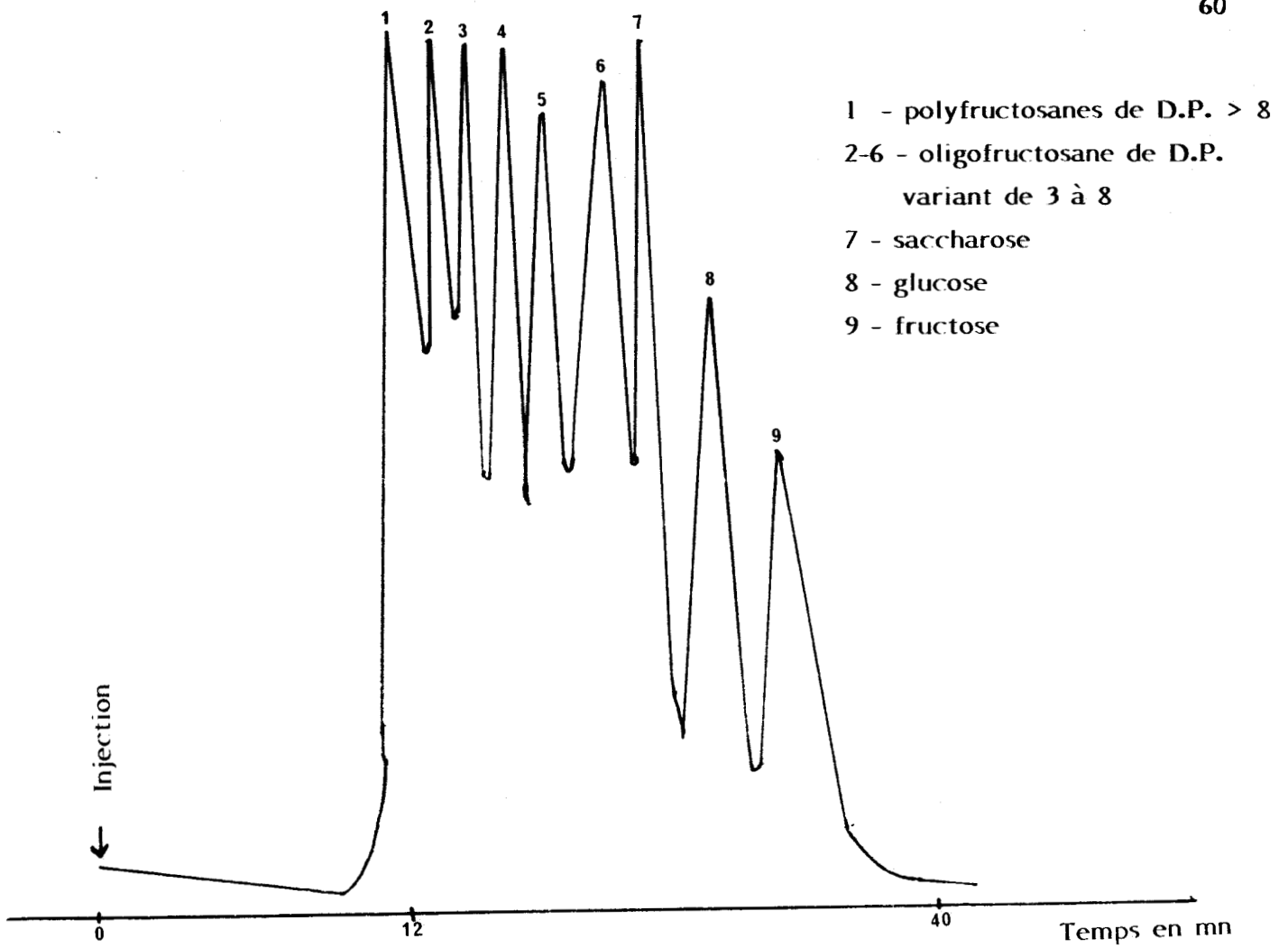


FIGURE 11 : Séparation d'un extrait hydroalcoolique à 85 % de racines de chicorée sur colonne biogel P2 suivie d'une détection au réfractomètre.

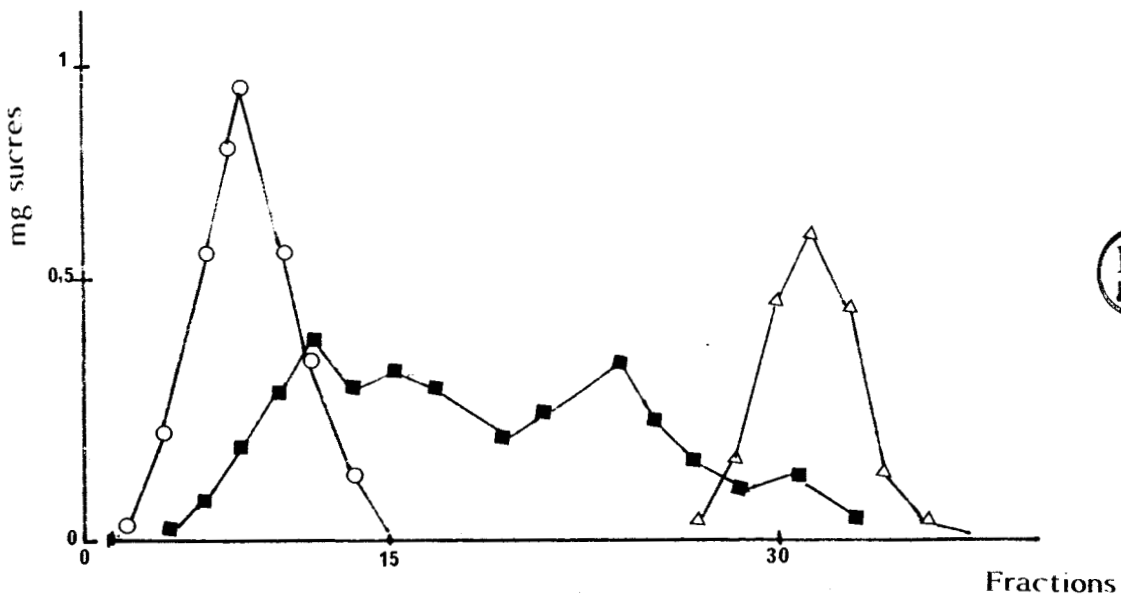


FIGURE 12 : Séparation d'un extrait de racine de chicorée sur gel de filtration G25, suivie d'un dosage des sucres totaux.

(○) Inuline ; (△) Fructose ; (■) Extrait de chicorée

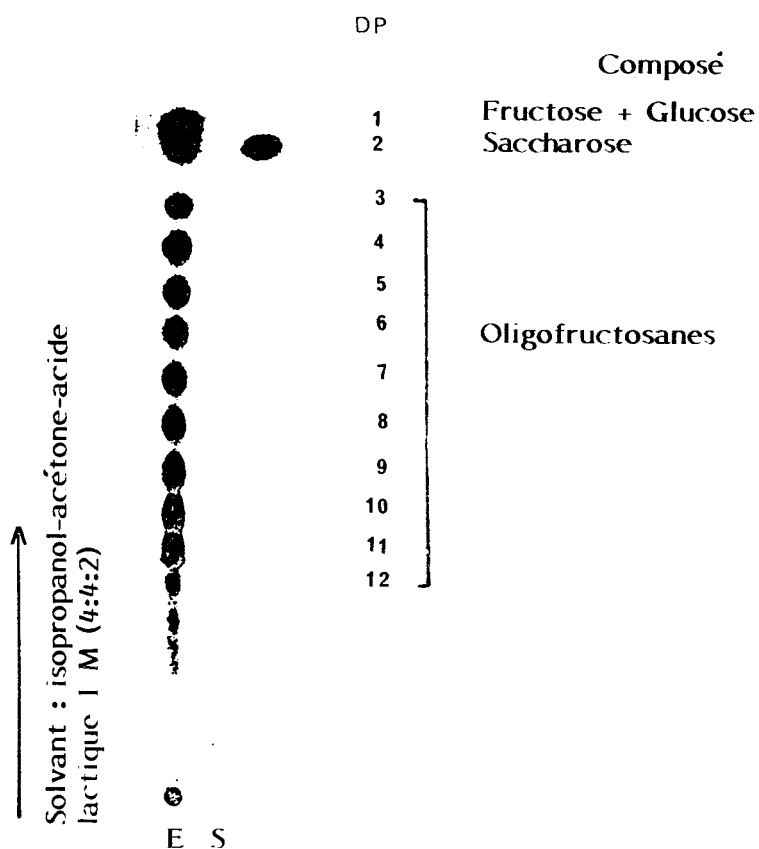


FIGURE 13 : Séparation sur plaque de silice d'une série d'oligofructosanes à partir d'un extrait hydroalcoolique de racines de chicorée.

E : Extrait hydroalcoolique

S : Témoin saccharose

1 à 12 : degrés de polymérisation



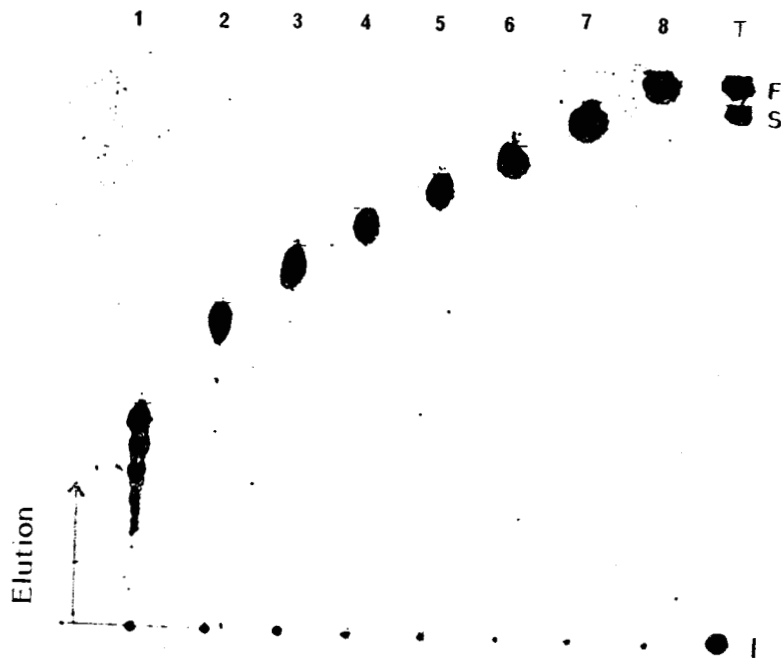


FIGURE 14 : Identification des pics par chromatographie sur couche mince après séparation chromatographique sur colonne biogel P2.

Extrait : 1 - 6 : oligofructosanes de D.P. = 8 à 3 ;

7 : saccharose ; 8 : hexoses

T (témoin) : F : fructose ; S : saccharose ; I : inuline

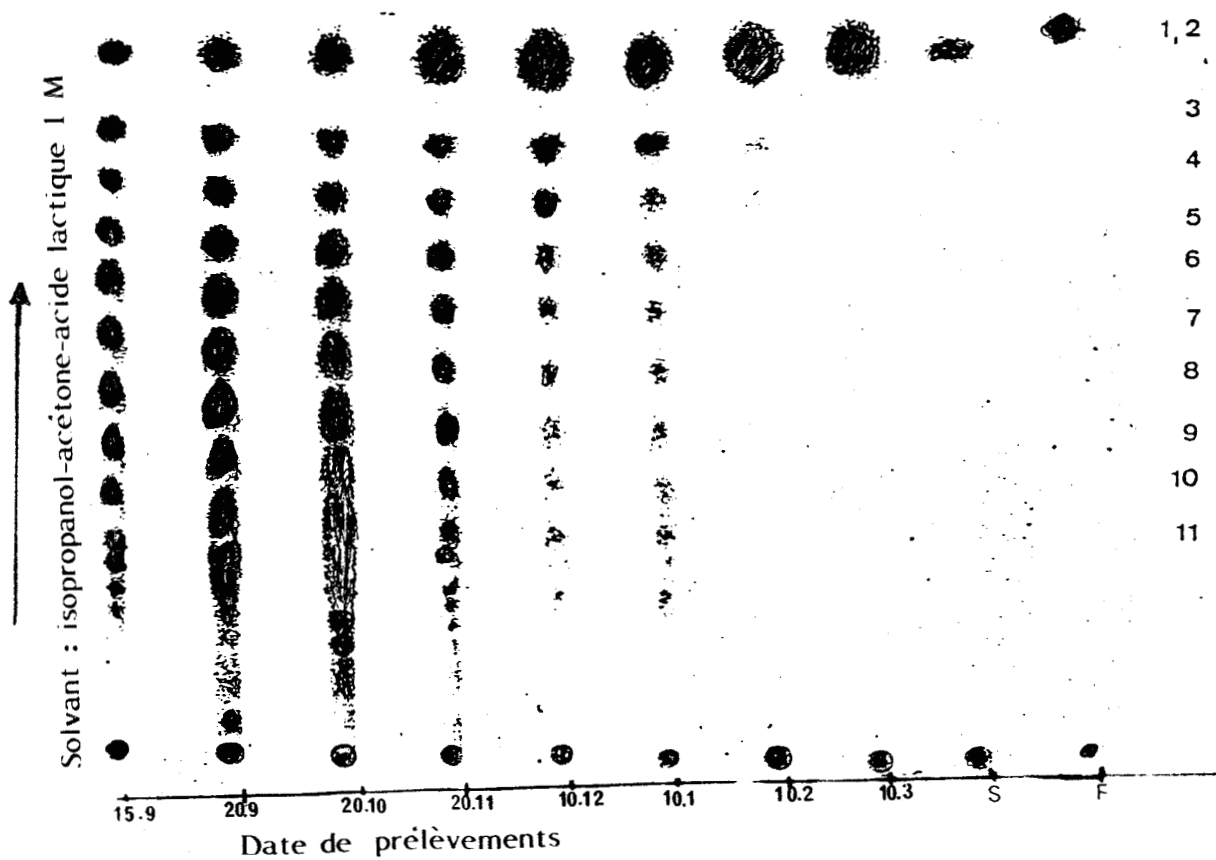


Figure 15 : Séparation sur couche mince d'un extrait de chicorée au cours de son évolution physiologique avant le forçage.

S : témoin saccharose

F : témoin fructose

1 à 12 : degrés de polymérisation

Nous constatons que chaque pic chromatographique correspond à une seule tâche, à l'exception du pic  $n = 1$  qui est composé de plusieurs fructosanes de D.P.  $\geq 8$ .

Cette méthode simple, rapide et reproductible peut être utilisée efficacement pour suivre l'évolution des glucides dans la racine d'endive au cours de son évolution physiologique avant et après forçage (FIGURE 15 ).

## 2. ANALYSES QUANTITATIVES

### 2.1 - Variation de la composition en glucide au cours de la croissance de la racine

Pendant la phase de croissance et de grossissement de la racine au champ, en général entre août et octobre, la racine accumule des oligo-fructosanes et des fructosanes de degré de polymérisation plus élevé (inuline) ; sa teneur en sucres simples, saccharose et hexoses (glucose, fructose), demeure à cette époque toujours relativement basse (FIGURE 16).

L'accumulation maximale des glucides polymérisés se produit début octobre, au plus tard début novembre, avec une variation de quelques jours suivant les conditions climatiques de l'année. La teneur en glucides totaux peut présenter jusqu'à 20 % de la matière fraîche.

Par ailleurs, nous constatons que vers la fin de la phase de grossissement, la teneur en fructosanes diminue et celle en sucres simples augmente ; il se produit donc une évolution en sens inverse des teneurs en glucides plus polymérisés et des teneurs en glucides moins polymérisés. Par la suite, les teneurs de ces deux fractions glucidiques deviennent sensiblement égales. Après arrachage, les racines sont conservées à basse température, et dans ces conditions les teneurs en glucides polymérisés qui avaient déjà commencé à diminuer, continuent de baisser pour atteindre, à partir du mois de janvier, leur valeur minimale. Les teneurs en glucides simples continuent de croître pour se stabiliser à un maximum qui se maintient jusqu'à fin mars, époque à partir de laquelle les teneurs tendent à baisser.

### 2.2 - Variation de la composition en glucides de la racine au cours du forçage

Les forçages sont réalisés pendant 18 à 21 jours à 20° C sur des racines prélevées au cours de leur phase de grossissement. Les dosages des glucides sont effectués sur des racines avant et après forçage, en utilisant les méthodes colorimétriques pour les sucres simples et les sucres totaux, et l'H.P.L.C. pour les fructosanes. Les résultats, résumés dans la FIGURE 17 mettent en évidence les observations suivantes :

Le forçage se traduit par une forte baisse des teneurs en glucides totaux : de 40 à 60 % des teneurs avant forçage. Cette diminution en masse

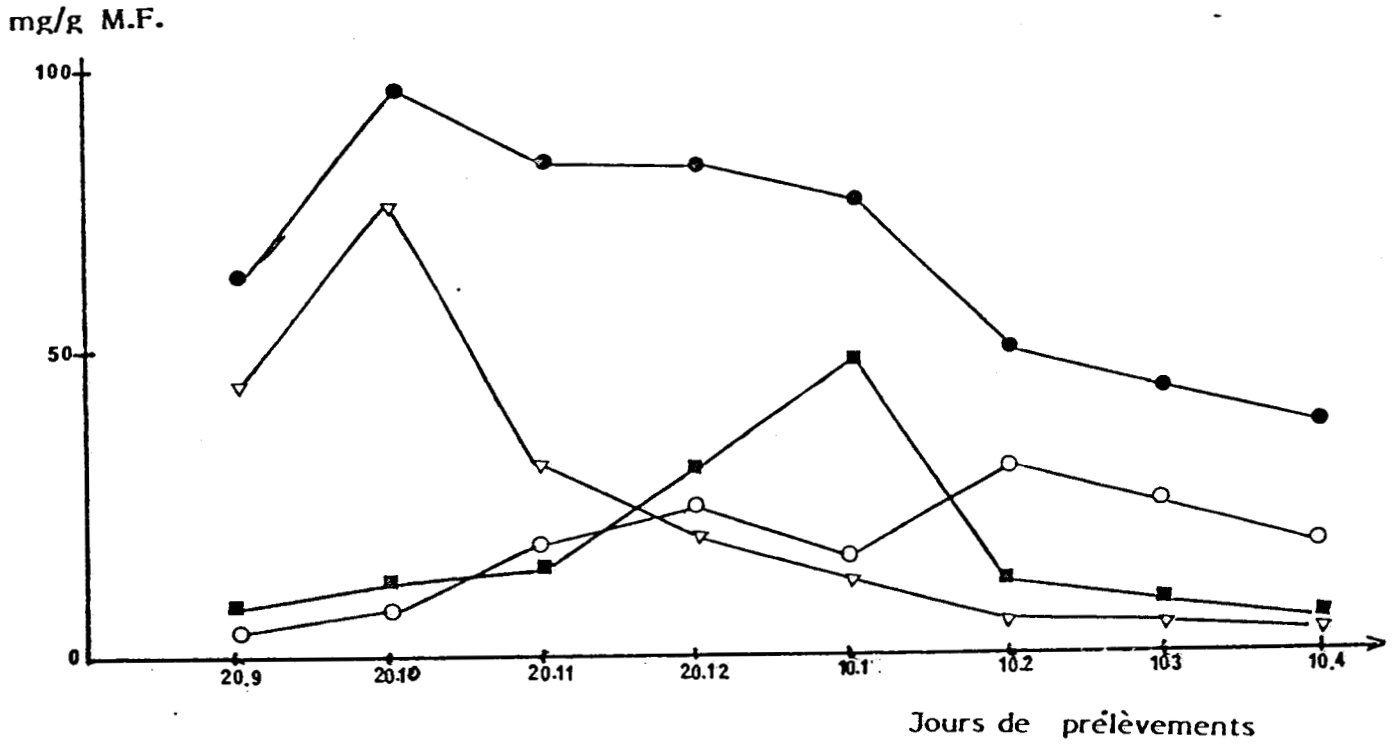


FIGURE 16 : Variation des teneurs en glucides de la racine de chicorée au cours de son évolution physiologique avant forçage.

(●) glucides totaux ; (▽) fructosanes ; (■) saccharose ;  
 (○) sucres réducteurs



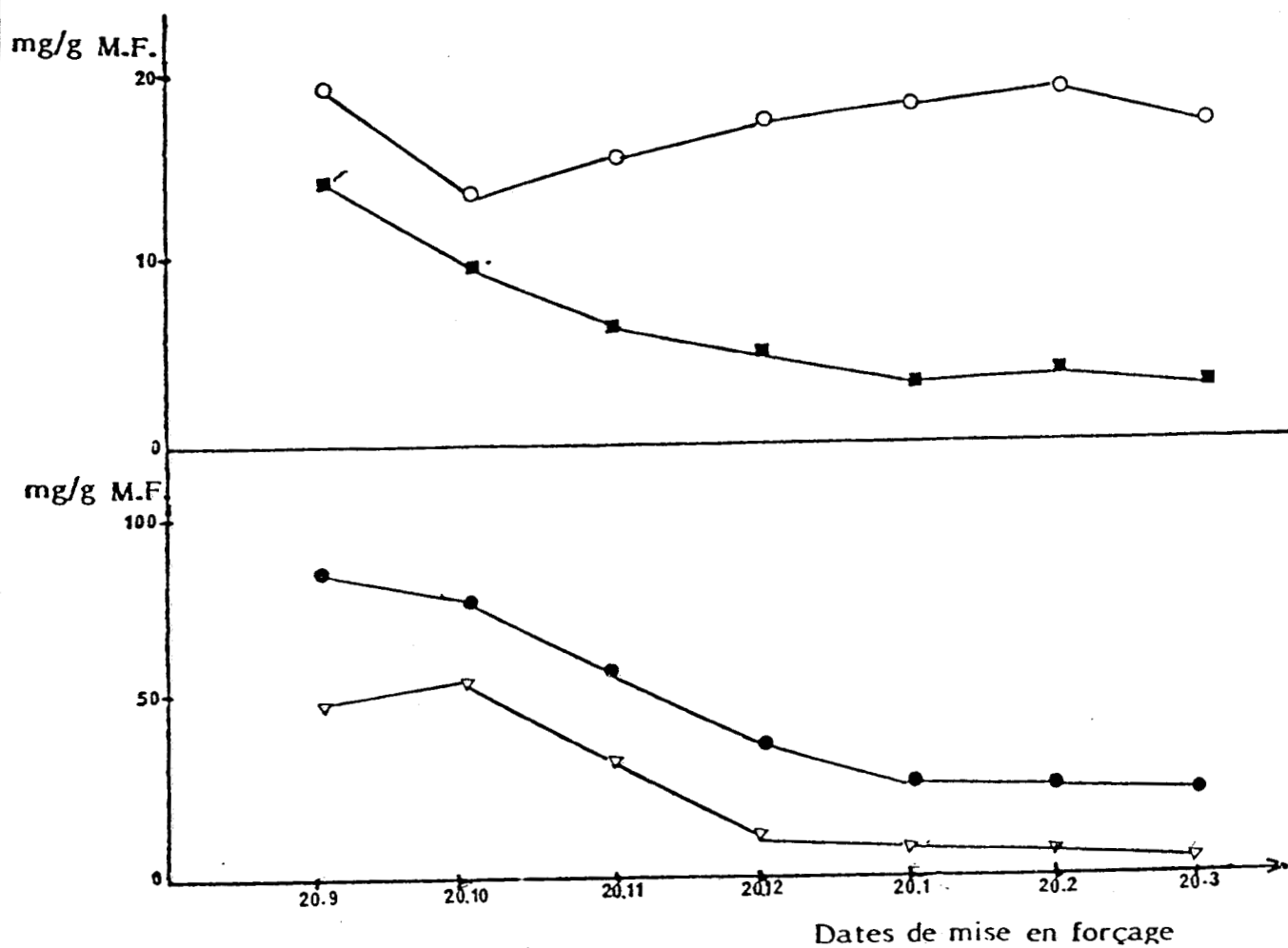


FIGURE 17 : Modifications de la composition glucidique de la racine de chicorée sous l'effet du forçage.

(●) glucides totaux ; (▽) fructosanes ; (■) saccharose ;  
 (○) sucres réducteurs





est due principalement à une forte dégradation des fructosanes. Parallèlement, le saccharose formé et le saccharose préexistant sont aussi fortement utilisés, vraisemblablement comme forme de transport de carbone et d'énergie vers le chicon, ou comme source de métabolites variés comme le CO<sub>2</sub> respiratoire et les hexoses dont la teneur augmente.

L'emploi de substrat marqué au <sup>14</sup>C, comme le saccharose, devrait permettre de suivre le devenir du carbone dans la racine au cours de son forçage.

Si le forçage est effectué tôt (septembre - octobre) au début de la phase de maturité, la teneur en glucides totaux s'élève légèrement, ce qui suggère que les réactions anaboliques l'emportent encore sur les réactions cataboliques, le saccharose est moins utilisé ainsi que les hexoses, les fructosanes ne subissent qu'une faible dégradation.

Par ailleurs, nous avons suivi l'évolution des composés glucidiques de la racine au cours du forçage. L'analyse des glucides est réalisée séparément sur un extrait éthanolique à 85 % renfermant les oligofructosanes de D.P. faible (3 à 8), le saccharose et les sucres réducteurs. Un extrait aqueux contenant les fructosanes de degrés de polymérisations supérieurs à 8 a aussi été suivi.

Les résultats des dosages obtenus, résumés dans la FIGURE 18 confirment que la dégradation des glucides totaux au cours du forçage est progressive et concerne surtout les fructosanes de D.P. supérieurs ; les oligofructosanes et le saccharose constituent la fraction prédominante. Ces oligofructosanes de D.P. faible sont en proportions sensiblement équivalentes avant forçage et subissent une diminution parallèle au cours du forçage. Il en est de même du saccharose. La dégradation de ces composés glucidiques s'accompagne d'une accumulation progressive des hexoses (TABLEAU 8).

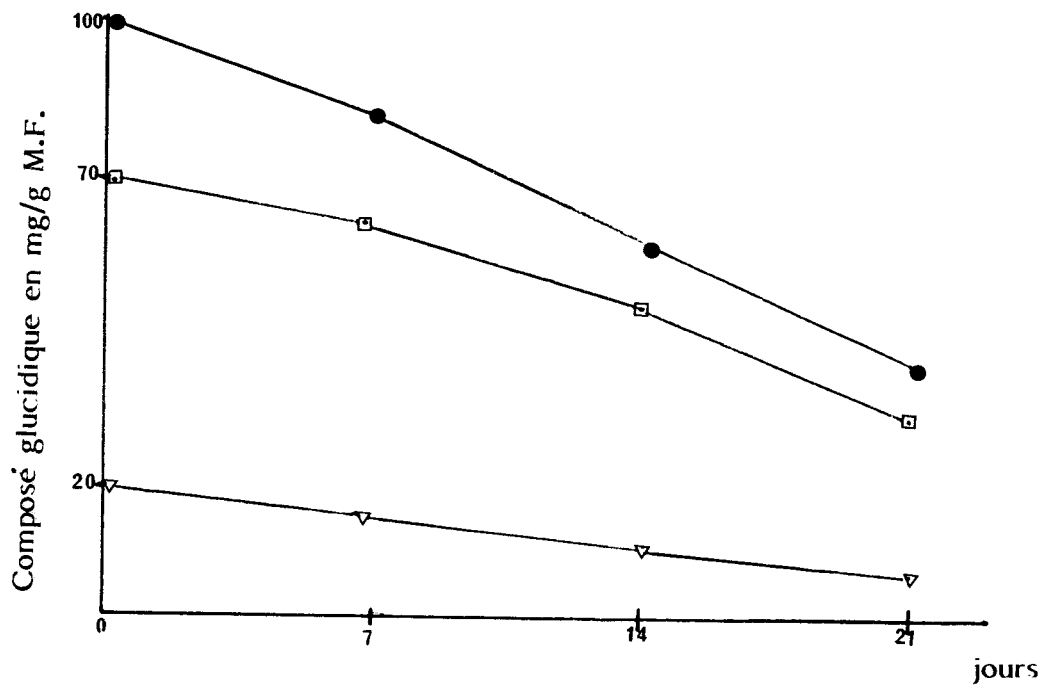


FIGURE 18 : Evolution des composés glucidiques de la racine d'endive au cours du forçage.

(●) sucres totaux

(◻) oligofructosanes + saccharose + sucres réducteurs

(∇) polyfructosanes de D.P. ≥ 8



Nombre de jours de forçage	Composition glucidique mg/g M.F.		
	Oligofructosane de D.P. $\leq 8$	Saccharose	Sucres réducteurs
0	40	22,5	5
7	23,5	16	10
14	11,3	13	16
21	6,5	9	17,9

TABLEAU 8 : Evolution des oses et des oligosides de D.P.  $\leq 8$  au cours du forçage.



### 3. CONCENTRATION EN SUCRES TOTAUX DE JUS D'EXTRACTION PAR DIFFUSION AQUEUSE A HAUTE TEMPERATURE

Il est très difficile actuellement de réaliser des cultures microbiologiques ou des conversions enzymatiques en milieu solide constitué d'un broyat de racines riches en inuline. Il est nécessaire avant d'aborder la transformation des polyfructosanes de pouvoir les extraire à partir des racines sous forme de solution concentrée. Nous avons étudié trois paramètres influençant cette extraction et la composition chimique des jus obtenus : le temps de contact, la température et le pH du broyat sur l'extraction. Nous avons déterminé dans ces diverses conditions, la concentration en sucre (TABLEAU 9 ) ainsi que le taux d'hydrolyse exprimé par le rapport :

$$\frac{\text{sucre réducteurs}}{\text{sucre totaux}}$$

(FIGURE 19 ) à pH 2 et à pH 5,5.

On constate que la concentration en sucres totaux des jus varie en fonction des divers paramètres (40 à 80 g/l) ; ces chiffres semblent plus faibles que ceux trouvés par **GUIRAUD (1981)** chez le topinambour (130 g/l). Ceci semble lié aux erreurs expérimentales dues à l'hétérogénéité du broyat, aux grandes dilutions et surtout à la période d'extraction.

Dans ces conditions, on a obtenu un rendement de 50 à 60 %, ces conditions ne permettent évidemment pas de récupérer totalement les sucres de la racine.

L'extraction des sucres de la chicorée est facile, contrairement à ce que laisse supposer les propriétés de l'inuline hautement purifiée (Merck). Ceci peut s'expliquer par le fait que le jus d'endive contient des sucres de poids moléculaire faible (D.P. faible) en quantité importante et que l'inuline *in vivo* possède des propriétés de solubilité particulières que ne possède plus l'inuline ayant cristallisé (**PHELPS, 1965**). Cette propriété est particulièrement intéressante pour la production de sirops sucrés après hydrolyse enzymatique.

La teneur en sucres réducteurs des jus et donc le pourcentage d'hydrolyse augmente avec le temps de contact, l'acidité et la température.

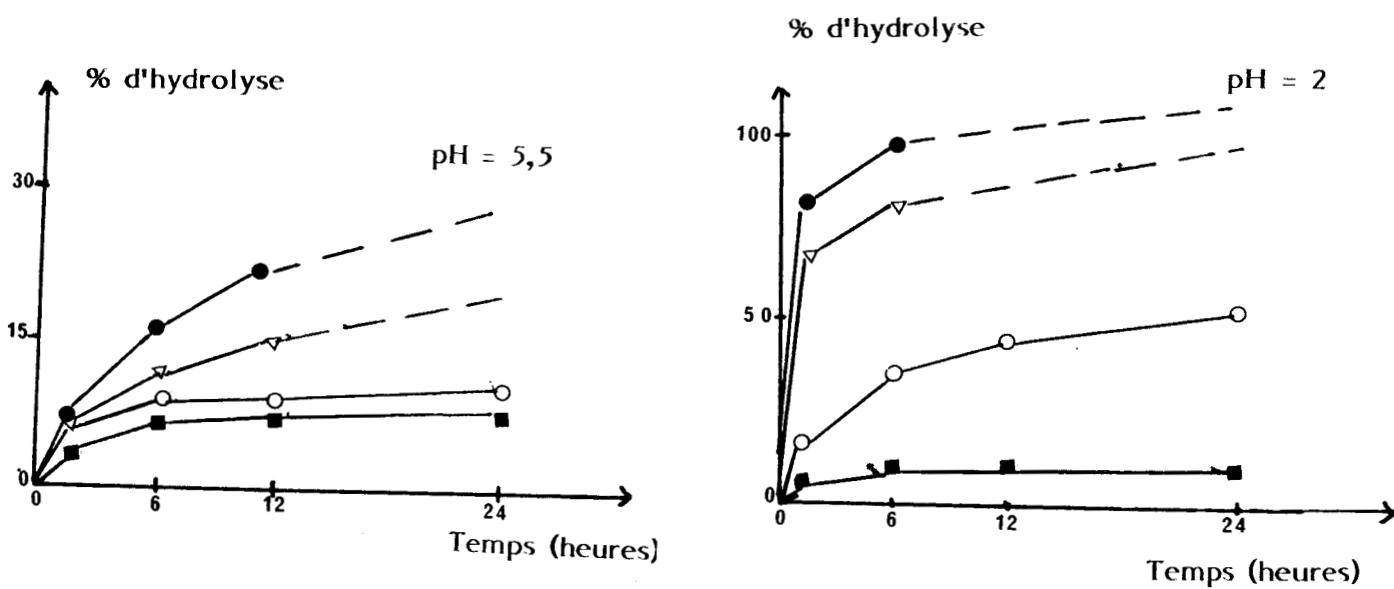


FIGURE 19 : Hydrolyse intervenant au cours de l'extraction de jus de chicorée dans diverses conditions de température et pH.

(●) 100° C ; (▽) 80° C ; (○) 60° C ; (■) 22° C



		TEMPERATURES							
	Temps de contact	22° C	30° C	40° C	50° C	60° C	80° C	100° C	
pH = 5,5	30 mn	45	55	60	65	75	80	82	
	60 mn	46	57	63	70	76	85	80	
	24 h	47,5	59	64	74	-	-	-	
pH = 3	30 mn	45	57	63	69	76	80		
	60 mn	45	57	63	69	78	86		
	24 h	48	55	66	73	-	-	-	
pH = 2	30 mn	42	51	61	70	76	88	86	
	60 mn	41	51	64	73	77	88	85	
	24 h	39	53	65	75	-	-	-	

TABLEAU 9 : Concentrations en sucres totaux obtenues dans diverses conditions de température, pH et temps de contact, de jus d'extraction de la racine d'endive.



#### 4. Conclusion

Nous avons montré que les réserves des racines ("carottes") d'endives sont constituées des polyfructosanes dont l'inuline constitue le polymère de haut poids moléculaire et on rencontre en quantité souvent importante le saccharose. De ce fait, la proportion de fructose dans les sucres extraits est plus faible que ce que l'on pouvait supposer ; ceci est particulièrement important si l'on envisage la production du fructose ; dans ce cas, il sera indispensable d'avoir un potentiel fructose le plus élevé possible et donc d'utiliser des extraits contenant le maximum de polymères à hauts poids moléculaires, nécessitant par la suite un procédé d'hydrolyse enzymatique.

Nous avons isolé une bactérie ayant une activité  $\beta$  fructofuranosidasi- que extracellulaire que nous allons étudier dans le chapitre suivant.

## CHAPITRE II

### Production de l'enzyme

— o o o —



## 1. MODE DE SELECTION DE LA SOUCHE

Les inulinases sont des enzymes généralement induites. Aussi, l'isolement des microorganismes producteurs a été jusqu'à présent réalisé à l'aide de milieux ne contenant que l'inuline comme seule source de carbone.

Nous avons examiné une série de bactéries capables de croître sur des solutions nutritives contenant de l'inuline comme seule source de carbone, en espérant en trouver quelques unes produisant une inulinase active.

### 1.1 - Repérage en milieu gélosé

Nous avons essayé trois méthodes :

Première méthode : adaptation de la méthode de **MENCIER (1972)**.

On coule, en boîte de Pétri, une première couche de gélose renfermant les éléments minéraux et azotés nécessaires à la croissance des microorganismes ; ces boîtes sont inoculées par la suspension bactérienne et l'ensemble est recouvert d'une couche mince de gélose blanche contenant l'inuline. Une incubation de ces boîtes permet de distinguer les colonies bactériennes qui dégradent l'inuline, en formant une auréole claire due à l'hydrolyse de l'inuline. Mais les résultats obtenus sont difficiles à interpréter car il n'apparaît que des microcolonies.

Deuxième méthode : adaptation de la méthode de **JASAYANKAR et GRAHM (1969)**. Il s'agit d'étaler à la surface d'un milieu gélosé contenant de l'inuline à  $5 \text{ g.l}^{-1}$ , une suspension des bactéries. Après incubation, on ajoute une solution aqueuse à 1 % de bromure de cetyltriméthyl ammonium qui rend visible le polymère par précipitation. L'apparition d'une zone claire autour des colonies permettra de visualiser l'hydrolyse de l'inuline et de repérer ainsi les souches productrices.

Troisième méthode : nous avons finalement mis au point une méthode simple et rapide. Un échantillon estensemencé sur milieu synthétique ne contenant que l'inuline comme source de carbone. Il est incubé pendant 48 à 72 heures, à  $30^\circ \text{ C}$ . Sur les colonies apparues, nous versons une solution d'éthanol, une auréole claire se forme autour de la colonie montrant la présence d'un système enzymatique hydrolysant l'inuline.

Cette méthode nous a permis de sélectionner quelques bactéries capables de dégrader l'inuline (TABLEAU 10).



### 1.2 - Repérage en milieu liquide

Les souches isolées sur milieu gélosé sont cultivées dans un milieu enrichi, suivi d'une culture sur milieu liquide synthétique contenant de l'inuline comme seule source de carbone. Les cultures ont été réalisées tout d'abord en tubes, ensuite en Erlen Meyer placés sur agitateur rotatif pendant 24 à 48 heures à 30° C. La quantité d'inuline restante dans le milieu est suivie par H.P.L.C.

Les résultats obtenus sont présentés dans le TABLEAU 11.

La souche E.M. 278 a été définitivement retenue, car il présente un certain nombre de caractéristiques intéressantes. Elle se développe rapidement et facilement sur milieu minéral synthétique simple contenant de l'inuline avec un taux de croissance nettement supérieur à celui des autres souches.

Le suivi de l'hydrolyse de l'inuline au cours de la croissance de cette souche montre qu'elle est totalement hydrolysée après 48 heures ; les autres souches ne produisent qu'une légère hydrolyse.

En outre, cette souche n'est pas pathogène et ne produit pas de composés toxiques.

### 1.3 - Etude de la croissance de la souche sélectionnée sur différents $\beta$ fructosides

Cette étude a pour but de définir un certain nombre de paramètres, notamment les caractéristiques de croissance sur différents substrats carbonés. L'étude a été conduite sur cinq substrats, dont quatre contenant au moins un fructose et le cinquième contenant du glucose :

- |              |   |                     |
|--------------|---|---------------------|
| - Inuline    | } | $\beta$ fructosides |
| - Raffinose  |   |                     |
| - Saccharose |   |                     |
| - Fructose   |   |                     |
| - Glucose    |   |                     |

Nous avons établi les courbes de croissance sur milieux synthétiques additionnés des substrats carbonés aux concentrations 0,5 % et 1 %. Pour établir chaque courbe, nous avonsensemencé une première préculture, puis une deuxième dont nous suivons la croissance lorsque celle-ci est en phase exponentielle, nous ensemençons la culture proprement dite ; cette

MICROORGANISMES	Croissance exprimée en D.O.		% d'hydrolyse de l'inuline	
	24 H	48 H	24 H	48 H
	Souche I.A.A.L. E.M. 278	4	4,75	96
Souche I.A.A.L. E.M. 295	2,5	3	65	75
<i>Bacillus polymixa</i>	1,7	1,9	25	30
<i>Bacillus subtilis</i>	1,85	1,95	34	37
<i>Bacillus sp.</i>	1,5	1,45	18	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,96	1,2	8	14
<i>Serratia</i>	1,5	1,75	45	48
<i>Streptococcus bovis</i>	0,86	0,95	3	7
<i>Streptococcus seris</i>	0,92	1,1	4,5	8
<i>Streptococcus ubis</i>	0,75	1,3	7	11
<i>Lactobacillus</i>	1,16	1,4	12	18
<i>Rhizobium meliloti</i>	0,35	0,75	4	6,5

TABLEAU 11 : Suivi de la croissance et de l'hydrolyse de l'inuline de différentes souches bactériennes cultivées dans un milieu synthétique contenant  $5 \text{ g.l}^{-1}$  d'inuline, cultures effectuées en Erlen-Meyer Sous agitation et à  $30^\circ \text{ C}$ .



technique évite la phase de latence. Les cultures sont effectuées à 30° C. La croissance est suivie au biophotomètre. Les différentes courbes obtenues sont représentées dans la FIGURE 20 . Les taux de croissance observés sont représentés dans le TABLEAU 12.

Substrat Concentration	Glucose	Fructose	Saccharose	Raffinose	Inuline
0,5 %	0,25	0,25	0,23	0,20	0,17
1 %	0,25	0,25	0,23	0,20	0,18

TABLEAU 12 : Taux de croissance exprimés en  $h^{-1}$  de la souche cultivée sur différents substrats.



Les taux de croissance obtenus sont identiques pour le glucose et le fructose ; ils sont très voisins pour le saccharose. Par contre, sur raffinose et sur inuline, les taux de croissance sont faibles. Il ne paraît pas y avoir influence de la teneur en substrat carboné sur le taux de croissance sauf dans le cas de l'inuline :  $0,17 h^{-1}$  à la concentration 0,5 % et  $0,18 h^{-1}$  à la concentration 1 %. Il faut noter que ce substrat (inuline) ne pénètre pas dans la cellule.

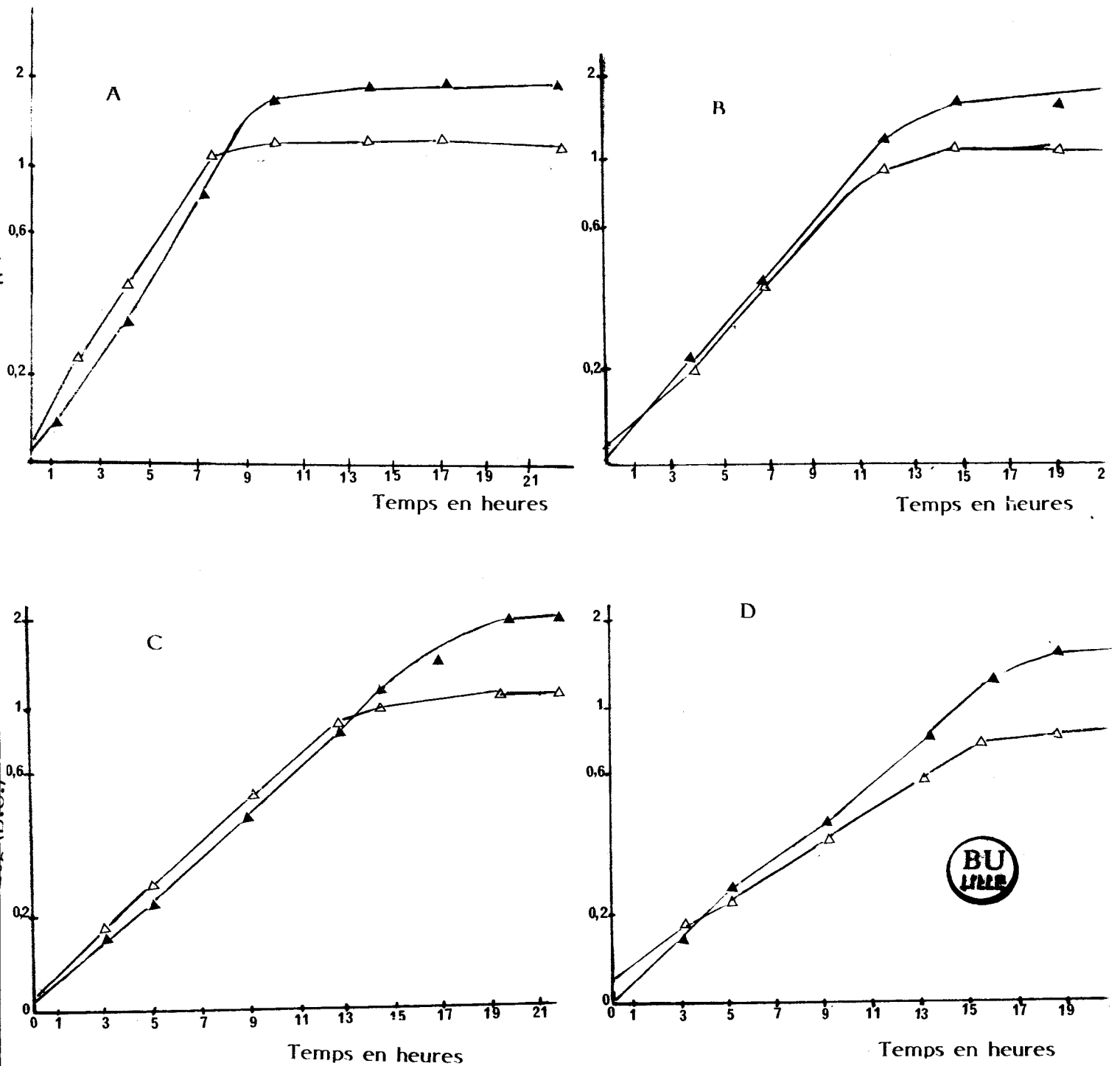


FIGURE 20 : Courbes de croissance de la souche sélectionnée dans le milieu synthétique, additionné d'une source de carbone à la concentration : (  $\Delta$  ) 0,5 % ou (  $\blacktriangle$  ) 1 %

A : glucose ; B : saccharose ; C : raffinose ; D : inuline

## 2. MISE EN EVIDENCE ET LOCALISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Les cultures sont effectuées sur milieu synthétique renfermant  $5 \text{ g.l}^{-1}$  d'inuline, les tests permettant de mettre en évidence l'activité enzymatique ont été réalisés sur des cultures en fin de phase exponentielle de croissance. A ce stade, plusieurs fractions sont préparées en appliquant le schéma de la FIGURE 21 .

- la fraction I : correspond au milieu de culture débarrassé des cellules par centrifugation ;
- la fraction II : correspond au culot cellulaire ;
- la fraction III : fraction insoluble obtenue par centrifugation suite à une lyse par sonication ;
- la fraction IV : fraction soluble.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le TABLEAU 13 .

L'activité se retrouve essentiellement dans le milieu de culture. Aucune activité enzymatique n'a pu être mise en évidence dans les cellules intactes et dans la fraction insoluble. Au niveau de la fraction soluble, l'activité est relativement faible, de l'ordre de 7 à 10 % de l'activité maximale. Nous avons également étudié l'activité des différentes préparations enzymatiques sur le raffinose et sur le saccharose. Ces activités sont toujours présentes à côté de l'activité inulinasique, mais elles sont toujours plus importantes. Nous avons ainsi déterminé le rapport inuline / saccharose ( $\frac{I}{S}$ ) qui est toujours inférieur à 0,5 ; ceci suggère la présence de deux activités enzymatiques : l'une invertasique et l'autre inulinasique. Nous verrons plus loin qu'il s'agit d'une seule fraction enzymatique active sur l'inuline et le saccharose.

### Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus sur les différentes fractions montrent que l'activité enzymatique se retrouve dans le surnageant ; ceci suggère que le système  $\beta$  fructofuranosidique chez la bactérie retenue est essentiellement extracellulaire.

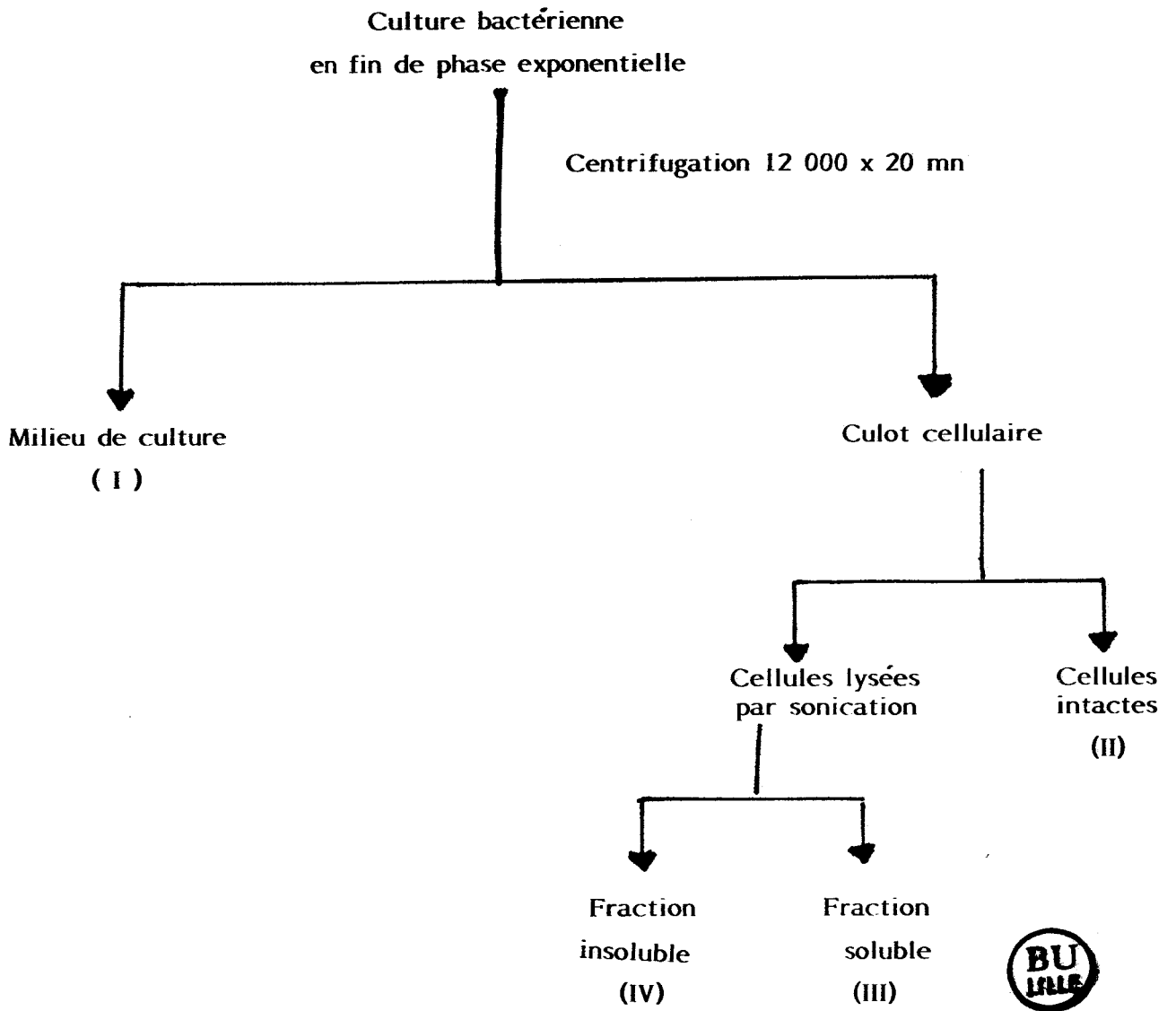


FIGURE 21 : Schéma des différentes opérations réalisées pour tester l'activité enzymatique des différentes fractions.



Fractions enzymatiques	Activité spécifique			Activité exprimée en % de l'activité maximale
	Inuline	Raffinose	Saccharose	
Fraction I : milieu de culture concentré	0,9	1,76	3,6	100 %
Fraction II : Cellules intactes	0	0	0	0 %
Fraction III : cellules broyées : fraction soluble	0,065	0,080	0,13	7 à 10 %
Fraction IV : cellules broyées : fraction insoluble	0,01	0,03	0,08	-

**TABLEAU 13** : Activité enzymatique de différentes fractions exprimée en  $\mu\text{mole}/\text{mn}.\text{mg}$  de protéines à partir d'inuline, de raffinose ou de saccharose (à pH 6 et à 40° C).



### CHAPITRE III

Paramètres modifiant l'apparition de

l'activité enzymatique

— o o o —

Nous venons de montrer que le système enzymatique chez la souche sélectionnée présentait la particularité d'être exclusivement excrété par les cellules dans le milieu de culture. Dans ce chapitre, nous allons étudier les principaux facteurs intervenant dans la régulation de la biosynthèse de l'enzyme.

Du fait du caractère inductible de ces enzymes, les inulinases étudiées jusqu'à présent ont toujours été produites à partir de milieux contenant de l'inuline. Les autres composants des milieux varient bien sûr avec les souches étudiées, mais aussi avec les auteurs. Il ressort de la littérature que les conditions de cultures et de productions ont été rarement étudiées ni bien définies.

## 1. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

L'effet de la température sur la croissance bactérienne et l'apparition de l'activité enzymatique a été étudié entre 20° C et 40° C au bain-marie, sous agitation.

L'activité enzymatique a été suivie pendant la phase stationnaire de croissance. La température optimale de croissance et d'apparition de l'activité maximale se retrouve aux environs de 30° C (FIGURE 22).

## 2. INFLUENCE DU pH

L'effet du pH initial du milieu synthétique a été testé à différentes valeurs entre 4 et 8.

La FIGURE 23 montre que la croissance et la production maximale d'enzyme sont obtenues à pH 6,5 et pH 7.

## 3. INFLUENCE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR L'APPARITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

### 3.1 - En croissance bactérienne

L'étude a été réalisée en utilisant comme substrats carbonés : le glucose, le fructose, le raffinose et l'inuline ; ces sucres ont été ajoutés au milieu synthétique à raison de 5 g/l. Les cultures ont été effectuées à 30° C et à pH 7 en Erlen Meyer sous agitation. La présence ou l'absence

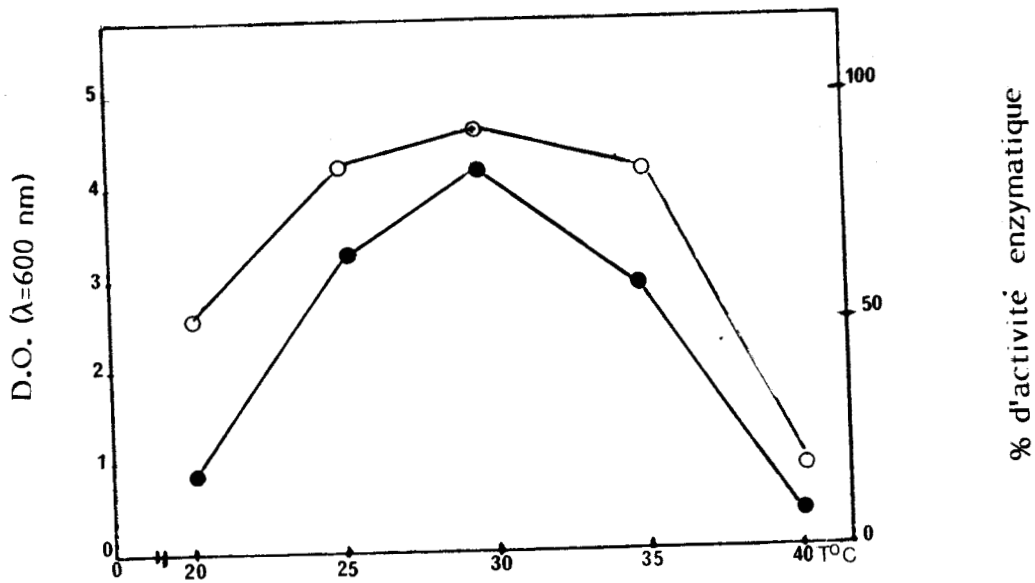


FIGURE 22 : Effet de la température sur la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique. Cultures effectuées en Erlen Meyer, après 24 heures de culture.

- (  $\circ$  ) croissance bactérienne exprimée en D.O.,  $\lambda$  600 nm  
 (  $\bullet$  ) activité enzymatique exprimée en % d'activité maximale

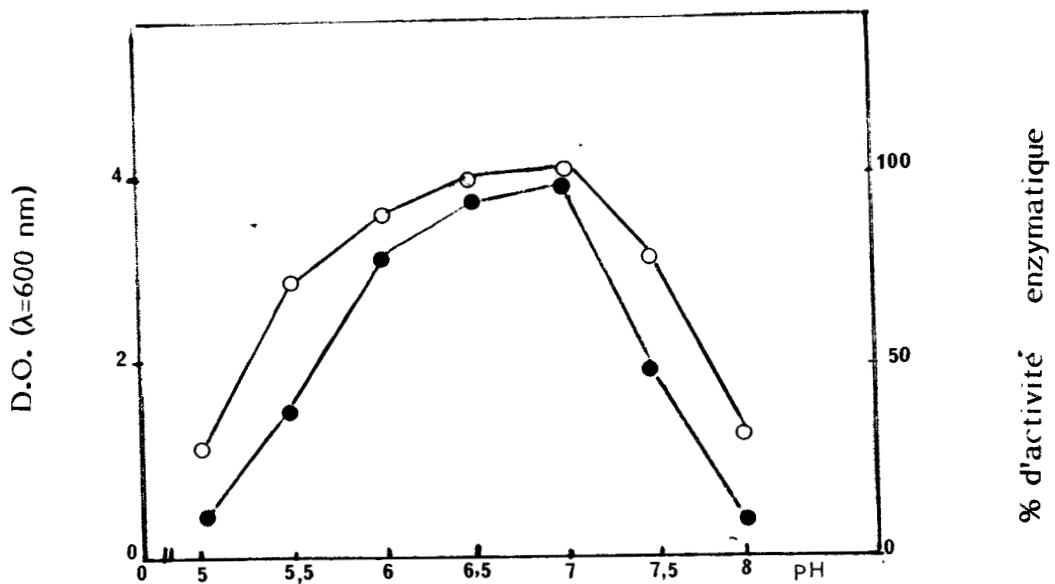


FIGURE 23 : Effet du pH sur la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique. Cultures réalisées sur milieu synthétique à  $5 \text{ g.l}^{-1}$  d'inuline à la température de  $30^\circ \text{ C}$ .

- (  $\circ$  ) croissance bactérienne exprimée en D.O.,  $\lambda$  600 nm  
 (  $\bullet$  ) activité enzymatique exprimée en % d'activité maximale



d'activité a été déterminée sur des cultures en fin de phase exponentielle de croissance.

Le TABLEAU 14 et la FIGURE 24 rassemblent les résultats obtenus. Les valeurs exprimées représentent la moyenne des résultats obtenus au cours de trois expérimentations distinctes pour chaque substrat.

La croissance bactérienne démarre rapidement en présence d'oses simples ; en présence d'inuline, le temps de latence est plus important. L'activité est très faible, et même nulle, après culture sur glucose et fructose.

Il apparait que l'activité est fortement induite par l'inuline, alors qu'elle l'est beaucoup plus faiblement par les autres  $\beta$  fructosides saccharose et raffinose ; il semble que l'inuline, seule, puisse permettre l'excrétion de l'enzyme dans le milieu.

Nous avons effectué ensuite des mesures d'activités sur milieu contenant de l'inuline additionnée de 0,5 % de glucose, l'ensemencement étant réalisé comme décrit précédemment.

### 3.2 - Essai d'induction de la synthèse de l'enzyme par des cellules en non prolifération

Des essais d'induction ont été effectués en non prolifération. Des cellules obtenues en fin de la phase exponentielle sur milieu synthétique additionné de 0,5 % de glucose sont transférées dans un tampon phosphate 0,01 M contenant 0,5 % des différents substrats carbonés (FIGURE 25 ) en Erlen Meyer agités à 30° C et à pH 7. A l'intervalle du temps régulier, un prélèvement est effectué et dialysé et on détermine l'activité enzymatique totale. Les résultats obtenus sont présentés sur la FIGURE 26 ; l'activité étant faible, nous avons exprimé l'activité enzymatique pour 100 ml, en fonction du temps de contact.

En présence du raffinose, du saccharose, du glucose ou du fructose, il n'y a pas d'induction de la biosynthèse. Lorsque le glucose est utilisé en présence d'inuline, l'activité trouvée est toujours faible. Par contre, en présence d'inuline seule, on constate une augmentation de l'apparition de l'activité. Il faut noter que l'activité enzymatique est inférieure à celle obtenue dans les conditions de multiplication cellulaire.

L'activité  $\beta$  fructofuranosidasique est donc fortement induite par la présence d'inuline et, à moindre degré, par celle des autres  $\beta$  fructosides. Le glucose semble même avoir un effet inhibiteur sur la biosynthèse de l'enzyme.

SUBSTRATS	Taux de croissance à h <sup>-1</sup>	Quantité d'enzyme en fin de phase exponentielle
Glucose	0,25	0,007 unité/ml
Fructose	0,25	0,01
Saccharose	0,23	0,06
Raffinose	0,20	0,08
Inuline	0,19	0,25

TABLEAU 14 : Etude de l'action de substrats carbonés sur les paramètres de croissance et la production d'enzyme.



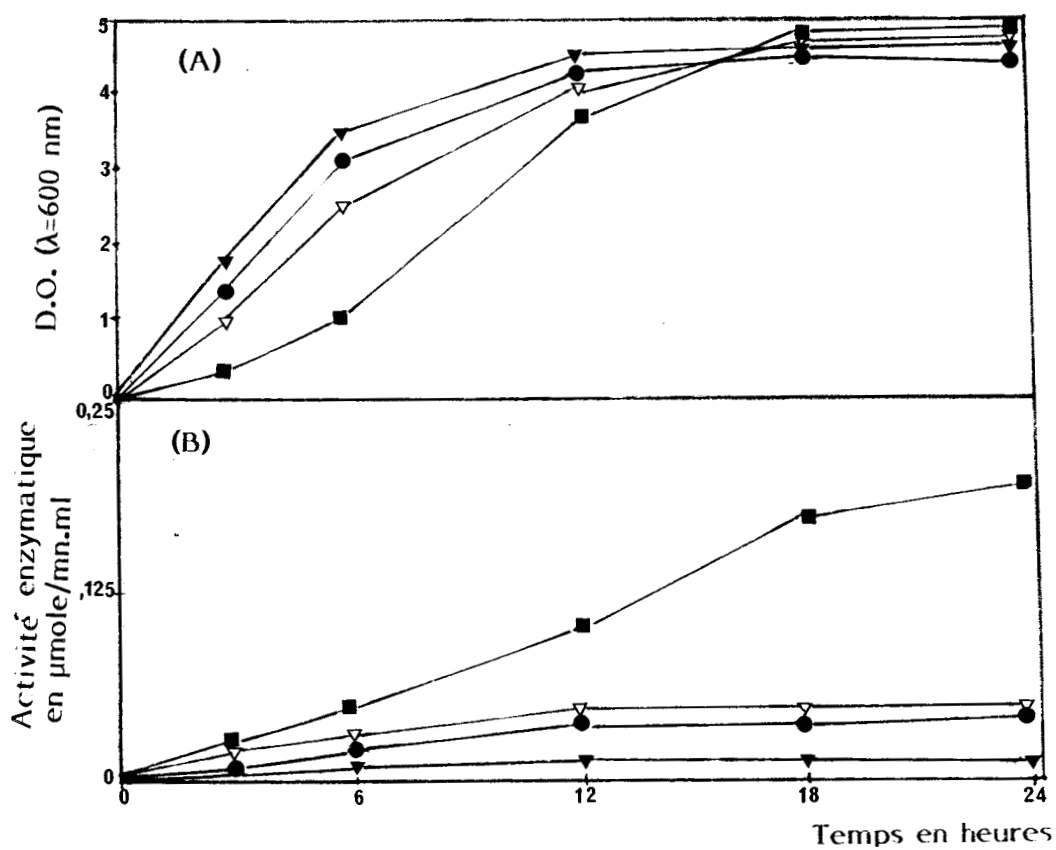


FIGURE 24 : Influence de la nature de substrats carbonés sur :

- la croissance bactérienne (A)

- l'apparition de l'activité enzymatique (B)

( ■ ) Inuline ; ( ∇ ) Raffinose ; ( ● ) Saccharose ; ( ▼ ) hexoses simples (glucose ou fructose)



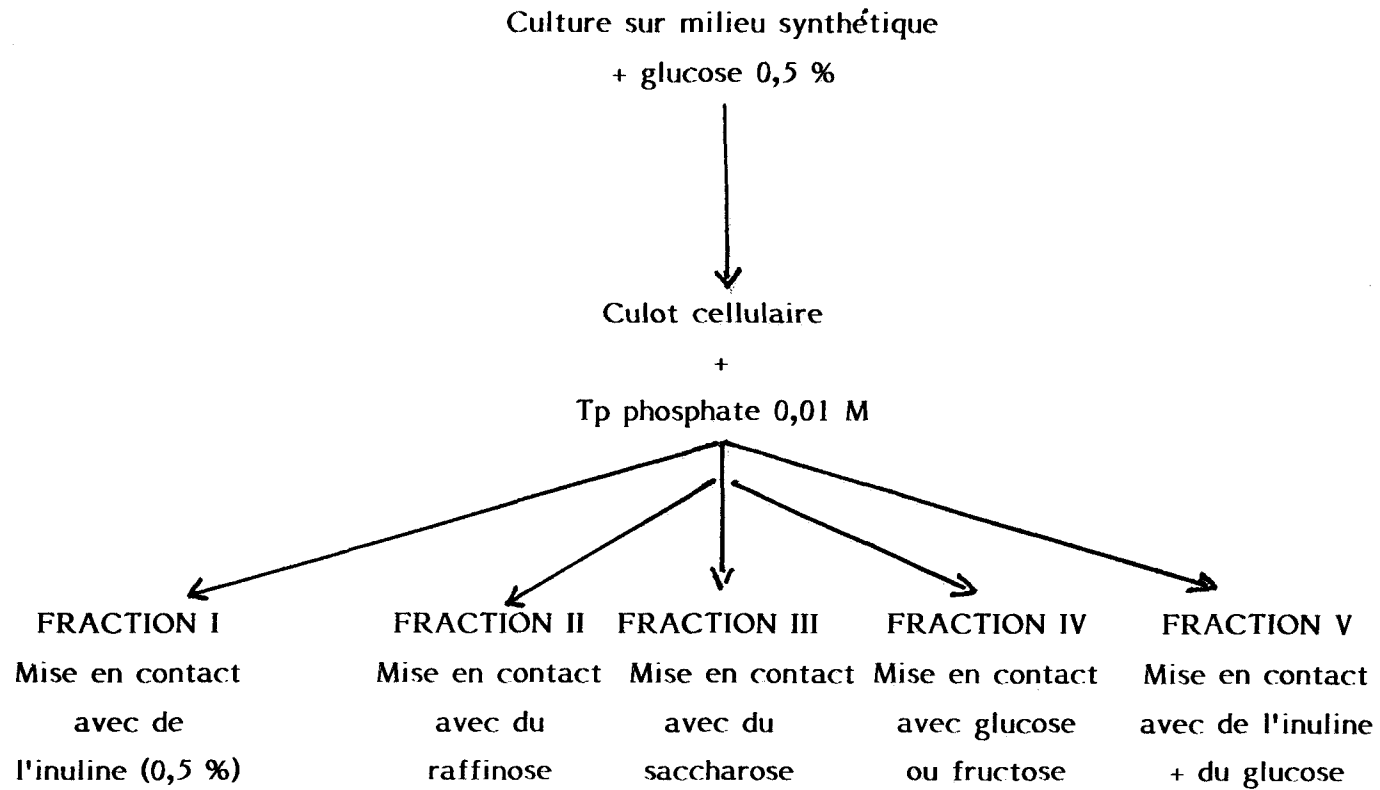


FIGURE 25 : Schéma général de l'étude comparative de l'apparition de l'activité enzymatique en non prolifération bactérienne.





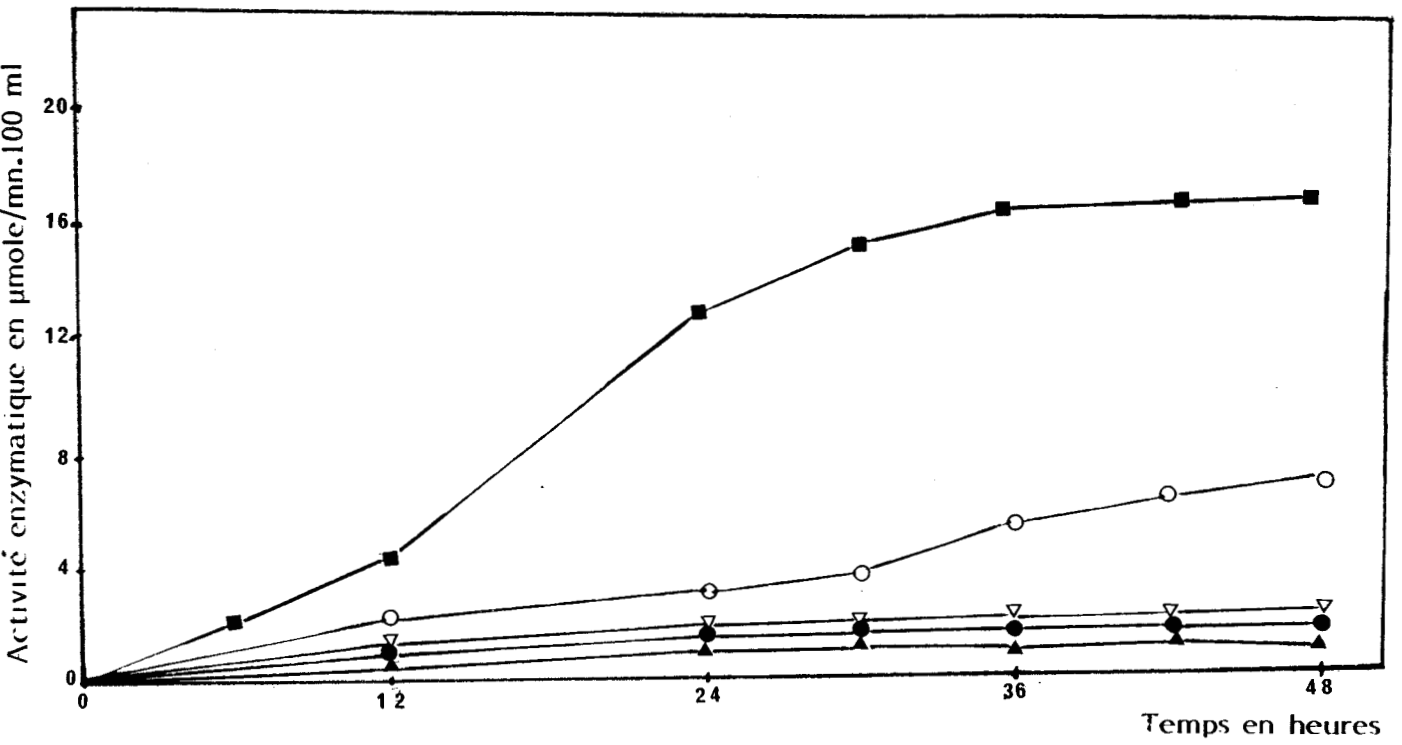


FIGURE 26 : Etude de l'apparition de l'activité enzymatique en non prolifération, en présence de :

- ( ■ ) inuline
- ( ○ ) inuline + glucose
- ( ▽ ) raffinose
- ( ● ) saccharose
- ( ▲ ) glucose ou fructose



#### 4. INFLUENCE DE LA SOURCE D'AZOTE

Nous avons testé un ensemble de substances azotées organiques et inorganiques.

Les substances ont été incorporées dans le milieu synthétique de manière à obtenir une concentration finale en azote de  $0,33 \text{ g.l}^{-1}$ . Trois sources d'azote minéral ont été utilisées, sous forme nitrique : nitrate de sodium, sous forme ammoniacale, chlorure d'ammonium, phosphate d'ammonium et, sous forme mixte, nitrate d'ammonium. En ce qui concerne la source d'azote organique, divers acides aminés ont été expérimentés : acide glutamique, asparagine, histidine, threonine, lysine, arginine et serine. Nous n'avons retenu que l'asparagine, les autres acides aminés n'ayant pas donné de résultat significatif (FIGURE 27 ).

La meilleure croissance est obtenue avec de l'azote sous forme nitrique ( $\text{NaNO}_3$ ). Le développement est plus réduit en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , et intermédiaire en présence de  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ .

En ce qui concerne la production d'enzyme, on constate une étroite corrélation entre la croissance bactérienne et l'apparition de l'activité.

En définitif, parmi les sources d'azote testées, le  $\text{NaNO}_3$  favorise l'apparition de l'activité enzymatique ; l'asparagine seule est incapable de conduire à la biosynthèse de l'enzyme.

#### 5. EFFET DES SELS MINERAUX

Cette étude est effectuée dans le milieu synthétique à pH 7 et à  $30^\circ \text{ C}$ , additionné de différentes concentrations de sels minéraux, l'activité enzymatique est déterminée après 28 heures de culture et exprimée en % d'activité maximale (TABLEAU 15 ).

Il semble que  $\text{MgSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ , sont les sels minéraux qui permettent la meilleure production d'enzyme. C'est ainsi que l'on a abouti à l'élaboration d'un milieu minéral synthétique équilibré, cité en Matériel et Méthodes.

#### 6. ETUDE DE L'APPARITION D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DANS LE MILIEU DE CULTURE AU COURS DE LA CROISSANCE EN PRESENCE D'INULINE EN FERMENTEUR

Nous avons étudié la biosynthèse de l'enzyme et l'hydrolyse de l'inuline au cours de la croissance. La culture a été effectuée à  $30^\circ \text{ C}$  en

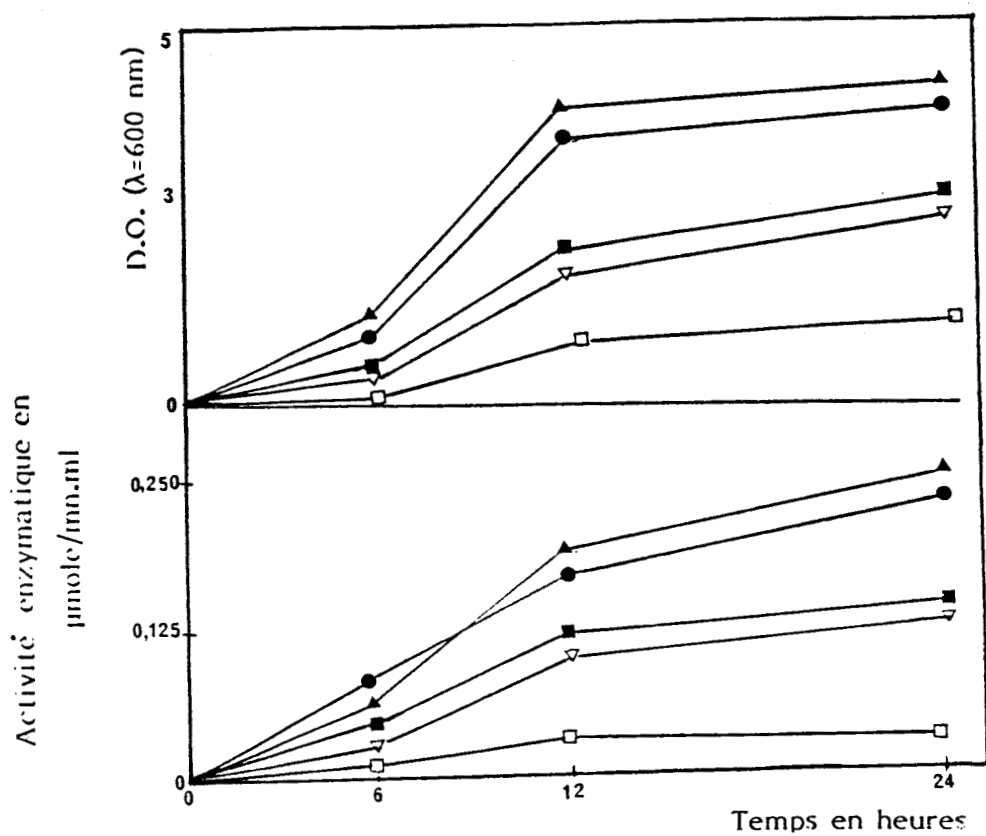


FIGURE 27 : Influence de la source d'azote sur :

(A) Croissance bactérienne

(B) Apparition de l'activité enzymatique

- ( ▼ ) NaNO<sub>3</sub>
- ( ■ ) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- ( ● ) NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>
- ( ▽ ) NH<sub>4</sub>Cl
- ( □ ) Asparagine



Sels minéraux en g/l	0,1	0,5	1	2
$\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	86	90	57	35
$\text{MgSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	87,7	100	70	55
$\text{Mn SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	85,2	90	63,75	38,63
$\text{Fe Cl}_2$	100	90	75	63
$\text{Zn SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	90	92	73	57
KCl	85	87	79	65
$\text{Ca Cl}_2$	100	88	78	59
$\text{K}_2 \text{H PO}_4$	85	100	87	77
$\text{Fe SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	100	87,2	70	65

TABLEAU 15 : Effet des sels minéraux sur l'apparition de l'activité enzymatique. Cultures effectuées en biophotomètre. Activités exprimées en % d'activité maximale.



réacteur de 3 l, sur milieu synthétique, à pH 7, contenant l'inuline à une concentration de  $5 \text{ g/l}^{-1}$ . La préculture est effectuée soit sur inuline, soit sur glucose ; dans ce dernier cas, nous avons observé une phase de latence de 4 à 6 heures, le taux de croissance au cours de la phase exponentielle est de  $0,24 \text{ h}^{-1}$ . Les résultats sont présentés dans la FIGURE 28 .

L'hydrolyse de l'inuline s'effectue progressivement dans le début de la croissance, elle est particulièrement rapide durant la phase exponentielle où plus de 70 % de l'inuline est hydrolysée. Nous n'avons jamais pu obtenir l'hydrolyse totale de l'inuline, même après 48 h de croissance. Par ailleurs, l'activité enzymatique augmente proportionnellement à la croissance bactérienne et se maintient à la même activité spécifique tout-au-long de la croissance. Les oses (fructose et glucose) issus de l'hydrolyse de l'inuline ne s'accumulent pas au cours de la croissance bactérienne et sont absorbés par les cellules au fur et à mesure de leur production.

## 7 -Discussion

Parmi les bactéries se développant bien sur l'inuline comme seule source de carbone, nous avons retenu une souche douée d'une activité  $\beta$  fructofuranosidique importante.

- Cette enzyme est surtout excrétée par les cellules dans le milieu de culture ; l'activité d'un broyat cellulaire est faible.

- A côté de son activité sur inuline, la préparation enzymatique agit aussi fortement sur les autres  $\beta$  fructosides (raffinose et saccharose), avec un rapport  $\frac{1}{5}$  (inuline / saccharose) d'environ 0,2.

- La biosynthèse de la  $\beta$  fructosidases est fortement induite par l'inuline et un peu par le raffinose et saccharose ; aucune activité n'est décelable après culture sur les hexoses simples. Le glucose réprime fortement sa biosynthèse. Le mécanisme de l'induction par une macromolécule resterait à expliquer. On peut se demander si l'inhibition par le glucose n'est pas le seul mécanisme de régulation, comme pour de nombreuses enzymes extracellulaires (HARDER, 1979).

- Le nitrate de sodium comme source d'azote et les autres sels minéraux qui constituent le milieu de culture synthétique jouent un rôle indéniable dans la biosynthèse de l'enzyme.

- La biosynthèse de l'enzyme s'effectue régulièrement au cours de la croissance bactérienne et se maintient au même niveau tout au long de la croissance.

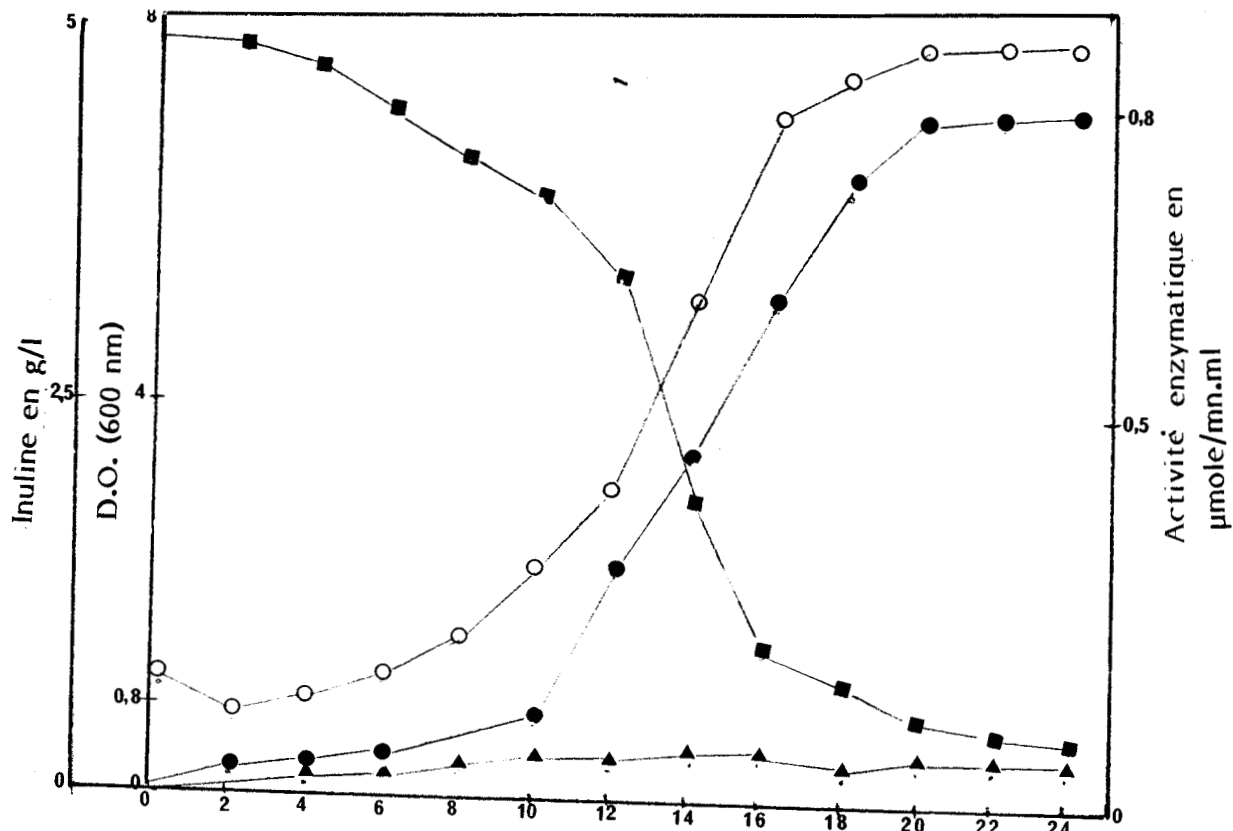


FIGURE 28 : Etude de l'apparition de l'activité enzymatique au cours de la croissance, en présence d'inuline : culture effectuée en réacteur.

( O ) croissance bactérienne (D.O.  $\lambda$  600 nm)

( ● ) activité enzymatique

( ■ ) inuline

( ▲ ) oses réducteurs



L'obtention d'une enzyme purifiée est indispensable pour mieux connaître ses propriétés catalytiques et les relations existantes entre la structure de la protéine et l'activité enzymatique.

Dans le chapitre suivant, nous aborderons cette étude.

## CHAPITRE IV

### Purification de l'enzyme étudiée

— o o o —



## 1. OBTENTION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE

Nous avons montré, dans le chapitre précédent, que les extraits obtenus à partir de corps bactériens étaient peu actifs. Toute l'activité enzymatique est obtenue dans le milieu de culture. Nous avons donc préparé l'enzyme à partir du milieu de culture.

Les bactéries sont cultivées en cuve de 3 l sur milieu minéral additionné de  $5 \text{ g.l}^{-1}$  d'inuline. La culture est arrêtée en fin de la phase exponentielle. Les bactéries sont éliminées par centrifugation (1 200 g pendant 20 mn).

La purification est effectuée par relargage au sulfate d'ammonium, chromatographie d'échange d'ions et par filtration moléculaire. Les opérations sont toutes réalisées à  $+ 4^\circ \text{ C}$ .

## 2. PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

La précipitation fractionnée par paliers de concentration de 10 % de saturation au sulfate d'ammonium révèle une courbe d'activité enzymatique présentant un seul pic au niveau de la fraction 60 - 70 %, alors que la teneur maximale en protéine est décelée dans la fraction 50 à 60 %.

La fraction inférieure à 30 % de saturation et celle supérieure à 90 % renferment peu d'enzyme. La fraction 30 - 80 % permet de récupérer plus de 80 % de l'activité (FIGURE 29).

Dans la suite du travail, toutes les expérimentations ont été conduites avec l'extrait ainsi préparé.

## 3. PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR D.E.A.E. CELLULOSE

Après passage de l'extrait obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium dialysé et tamponné à pH 6, sur une colonne de D.E.A.E. cellulose, la fixation de l'activité enzymatique, aussi bien sur saccharose, raffinose, que sur inuline, a été observée ; l'élution a été ensuite effectuée à l'aide du tampon phosphate 0,01 M utilisé pour la fixation, additionné de quantités croissantes de NaCl (gradient linéaire de 0 à 0,5 M).

Le dosage de l'activité dans les fractions obtenues a montré que l'activité enzymatique était éluée en une seule fois pour les concentrations en NaCl à 0,25 M (FIGURE 30).

Nous avons vérifié à chaque stade l'absence d'activité enzymatique en dehors du pic d'activité.

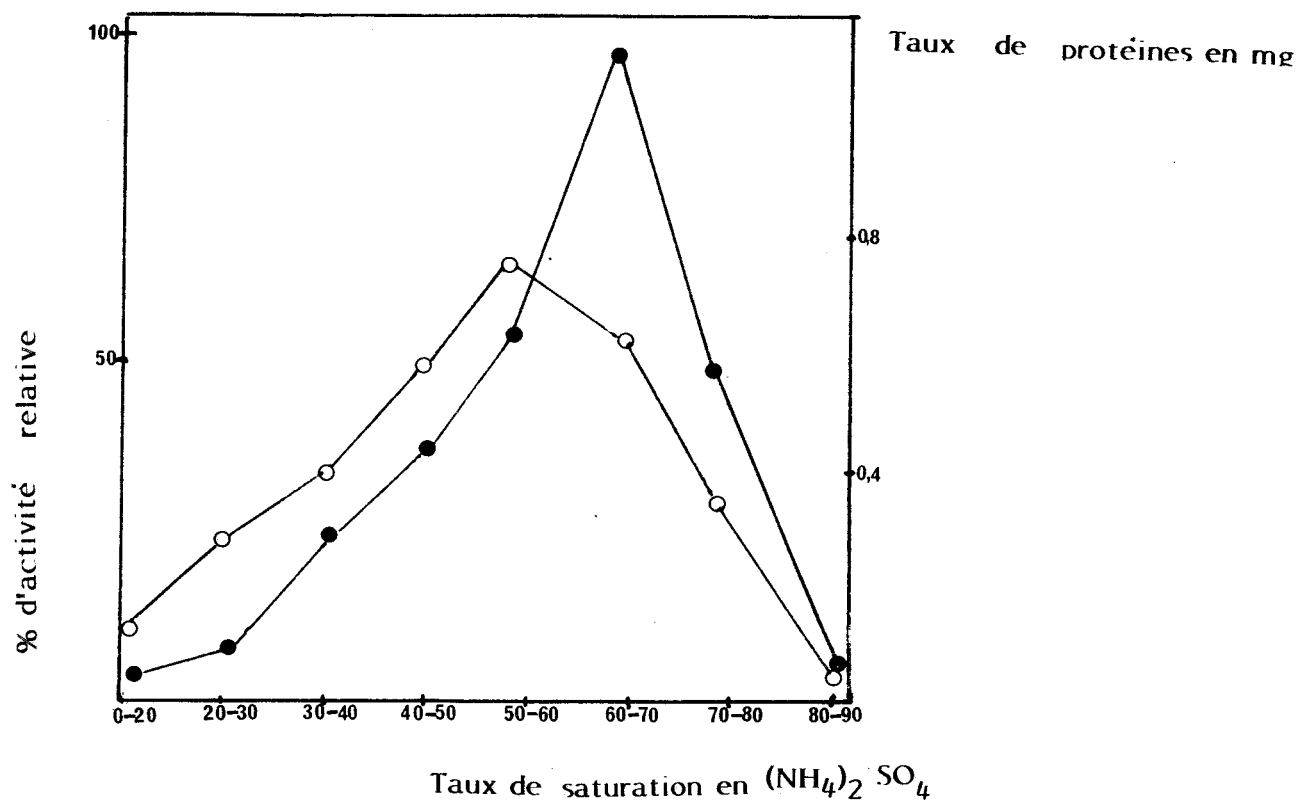


FIGURE 29 : Diagramme de précipitation des protéines en fonction de la saturation de l'extrait en sulfate d'ammonium.

( ○ ) taux de protéines

( ● ) % d'activité relative



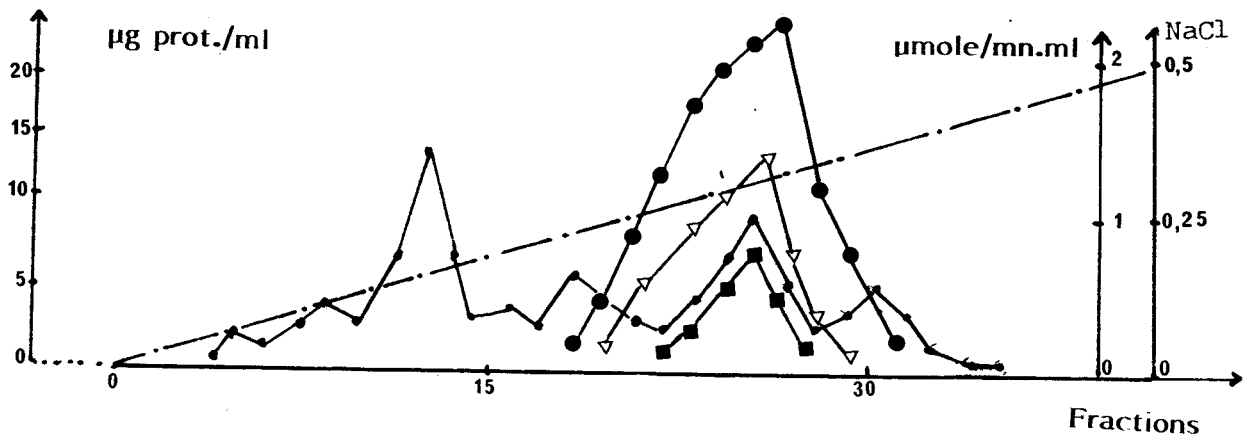


FIGURE 30 : Purification par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose.  
 ( ● ) Substrat saccharose ; ( ▽ ) Substrat raffinose ; ( ■ ) Inuline ;  
 (---) [NaCl] ; (—●—) Protéines

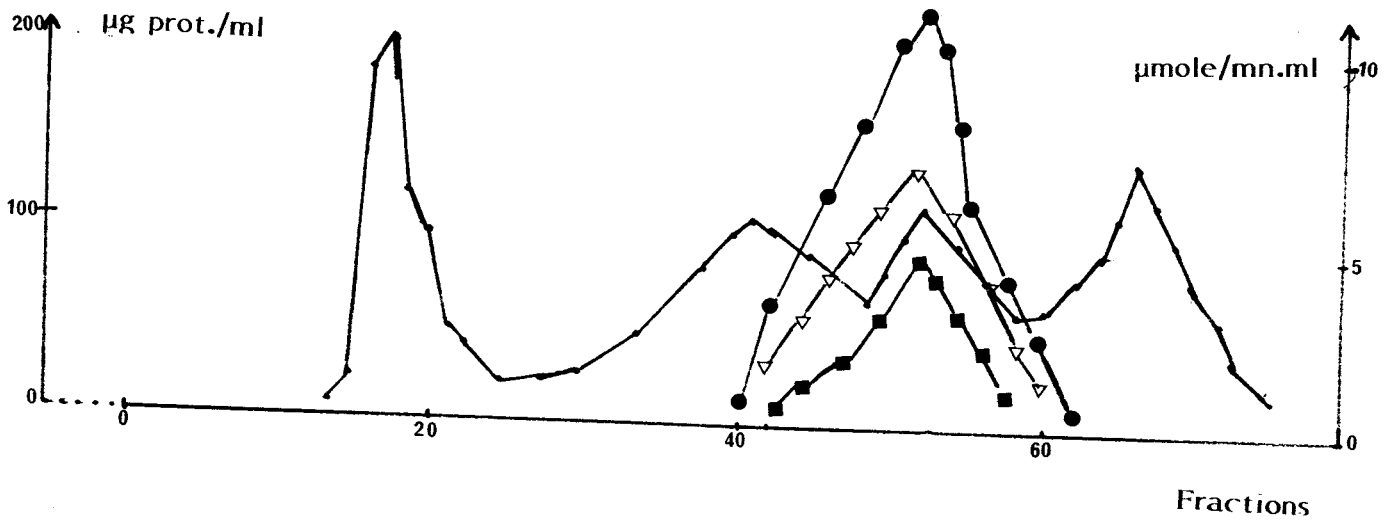


FIGURE 31 : Purification par filtration sur ultrogel ACA 34;  
 ( ■ ) Inuline ; ( ▽ ) Raffinose ; ( ● ) Saccharose ;  
 (—●—) Protéine en µg/ml



Les activités sur inuline, raffinose et saccharose se retrouvent parallèlement en une seule fraction.

#### 4. FILTRATION MOLECULAIRE SUR ULTROGEL A.C.A.34

La zone de fractionnement de ce gel étant plus étroite (20 000 - 400 000), la séparation des protéines est meilleure. Cette chromatographie par filtration a été effectuée comme précédemment à l'aide de l'extrait obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium dialysé et tamponné à pH 6. Le profil d'élution montre ici aussi un seul pic d'activité, l'activité sur inuline, raffinose et saccharose se retrouvent dans une même fraction (FIGURE 31).

#### 5. SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Les fractions actives issues de la colonne "gel de filtration, ultrogel A.C.A.34", sont chargées sur une colonne garnie de con A - Sepharose 4B qui fixe pratiquement l'activité enzymatique. L'élution s'effectue avec un tampon phosphate 0,05 M à pH 6 contenant  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  et  $Ca^{++}$  et NaCl 0,15 M. Le décrochage est fait avec le même tampon dans lequel on ajoute une concentration 0,3 M en  $\alpha$  D méthyl glucoside. C'est ce dernier mode d'élution qui donne le meilleur rendement de purification et la meilleure activité spécifique.



#### 6. BILAN DE LA PURIFICATION

Nous venons de montrer que le stade de purification le plus élevé est obtenu après passage sur gel de filtration suivi d'une chromatographie d'affinité (con A - Sepharose 4B). Par ailleurs, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'extrait obtenu purifié ne permet d'obtenir qu'une seule bande après coloration en bleu de coomassie.

Les caractéristiques des extraits obtenus à chaque stade de purification sont regroupées dans le TABLEAU 16 .

Après ces opérations, nous pensons que cet extrait ne contient qu'une seule protéine enzymatique active.

Extraits enzymatiques	Volume en ml	Protéines en mg	Activité enzymatique				I/S	Rendement en %
			Inuline		Saccharose			
			Total des activités	Activités spécifiques	Total des activités	Activités spécifiques		
Milieu de culture	500	550	188,20	0,34	649	1,18	0,28	100
Après précipitation au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (70 %)	40	70,3	148,40	2,11	600	8,53	0,25	80
Après D.E.A.E. cellulose	10	5	105	21	437,5	87,5	0,24	55,8
Après gel de filtration "Ultrogel ACA"	15	3,85	91,25	23,80	414,7	107,5	0,22	48,5
Après conA-Sepharose 4B	6	1,02	60	58,2	272,7	267	0,22	32

TABLEAU 16 : Bilan de la purification.  
L'activité enzymatique ( $\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ ) est mesurée à 40° C dans un tampon phosphate 0,02 M à pH = 6.



## CHAPITRE V

### Propriétés de l'enzyme purifiée

— o O o —

Les propriétés de la  $\beta$  fructofuranosidase ainsi purifiée ont été étudiées vis-à-vis de trois substrats : inuline, raffinose et saccharose.

## 1. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU pH

Les réactions enzymatiques sont très sensibles au pH du milieu et ceci tient à trois facteurs :

- les pH extrêmes modifient irréversiblement la structure de l'enzyme en dénaturant la protéine ;
- le pH modifie l'ionisation du substrat dans un grand nombre de cas ;
- le pH intervient sur la réaction enzyme - substrat et sur la catalyse en particulier en modifiant la dissociation des acides aminés et des sites actifs.

Ainsi, l'étude de l'influence de la concentration en ion  $H^+$  sur l'activité enzymatique a été réalisée en faisant varier le pH depuis pH 4 jusqu'à pH 10.

- \* Pour les pH compris entre pH 4 et pH 6, nous avons utilisé un tampon citrate ;
- \* Pour les pH variant de 5 à 8, un tampon phosphate ;
- \* Au-delà du pH 7,5, nous employons un tampon acide borique - borate.

Dans tous les cas, la réaction a été conduite pendant 20 mn à 40° C quand le substrat est l'inuline, 10 mn quand le substrat est le raffinose et 5 mn quand le substrat est le saccharose.

La FIGURE 32 (a), présente les résultats obtenus ; nous avons exprimé le pourcentage de l'activité trouvée aux différentes valeurs de pH par rapport au pH donnant la meilleure activité. Le pH optimum de la réaction pour les trois substrats se situe à pH 6. Pour des pH compris entre 5,5 et 7,5, l'activité reste supérieure à 70 %. A pH 4 et pH 9, l'activité enzymatique est nulle.

La courbe de dénaturation par le pH montre que l'enzyme reste stable au-delà du pH 4,5 [FIGURE 32 (b)].

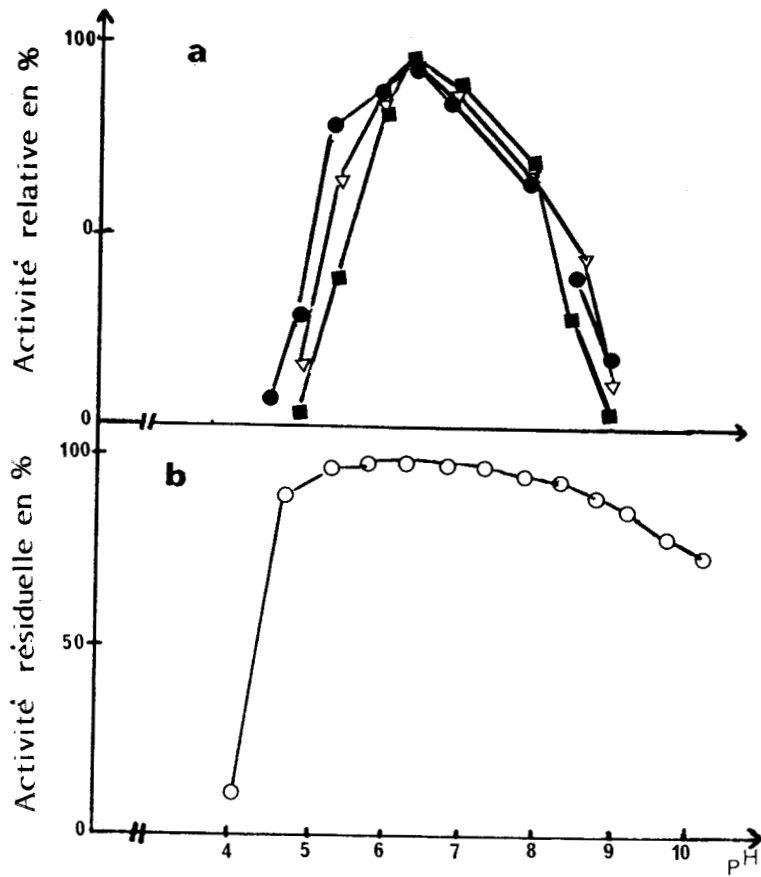


FIGURE 32 :

a) Influence du pH sur l'activité enzymatique en % d'activité au pH optimum.

(■) Inuline ; (▽) Raffinose ; (●) Saccharose

b) Influence du pH sur la stabilité de l'enzyme.

(○) % d'activité résiduelle estimée après incubation de la suspension enzymatique à différent pH, pendant 30 mn à 40° C.





## 2. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

### 2.1 - Action de la température sur la vitesse d'activité

L'action de la température sur la réaction enzymatique est la résultante de deux phénomènes :

- d'une part, l'accroissement normal de toute vitesse de réaction, lorsque la température s'élève. L'élévation de la température augmente le mouvement des molécules et, en conséquence, la vitesse des réactions chimiques ; en général, la vitesse de la réaction augmente exponentiellement avec la température.

- d'autre part, les enzymes étant des protéines, elles sont dénaturées par les températures élevées.

Dans les conditions expérimentales retenues, les vitesses de catalyse présentent une activité optimale pour les trois substrats à une température voisine de 50° C. A 30° C, la vitesse de catalyse correspond à la moitié de la vitesse maximale (FIGURE 33 ). Les activités spécifiques obtenues à pH 6 sont de 3,42 µmoles/mn.mg de protéines sur inuline, de 3,85 µmoles/mn.mg sur raffinose et de 15,80 µmole/mn.mg sur saccharose avec un rapport  $\frac{I}{S}$  de 0,22.

### 2.2 - Etude de la stabilité thermique

#### a) Stabilité aux températures basses :

La stabilité des protéines aux basses températures dépend du rapport entre les liaisons hydrogènes plus stables aux basses températures et les liaisons hydrophobes plus habiles, cette dénaturation réversible peut conduire soit à une dissociation de la protéine (SHIRAHASHI et COLL., 1978), soit à des changements conformationnels faisant apparaître une augmentation du nombre de sites hydrophobes à la surface externe de l'enzyme ou l'exposition du groupement thiols (CHOLLET et ANDERSON, 1977).

Dans nos conditions expérimentales, des fractions d'extraits enzymatiques purifiés, placées à basse température (+ 4° C) sont prélevées tous les huit jours pour mesure de l'activité enzymatique résiduelle.

Au cours des 20 premiers jours, l'activité reste constante ; elle baisse ensuite lentement, au moins 85 % de l'activité est retrouvée après un mois, puis la dénaturation s'accélère. Par contre, en présence de glycérol à 2 %, l'enzyme garde sa stabilité pendant deux mois (FIGURE 34 ) ; l'enzyme peut alors être stockée à - 20° C et reste stable pendant au moins 6 mois.

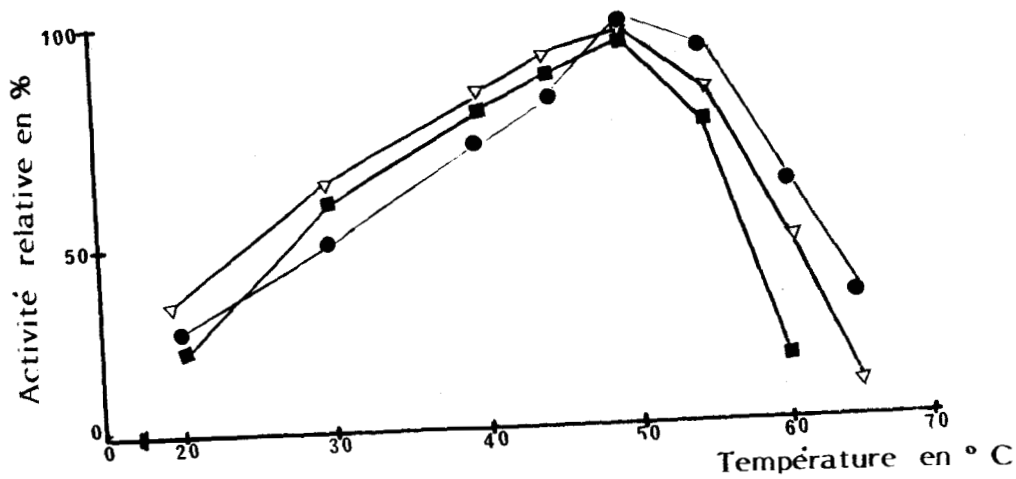


FIGURE 33 : Influence de la température sur l'activité enzymatique en % d'activité à la température optimale, à pH 6.  
 (■) Inuline ; (▽) Raffinose ; (●) Saccharose

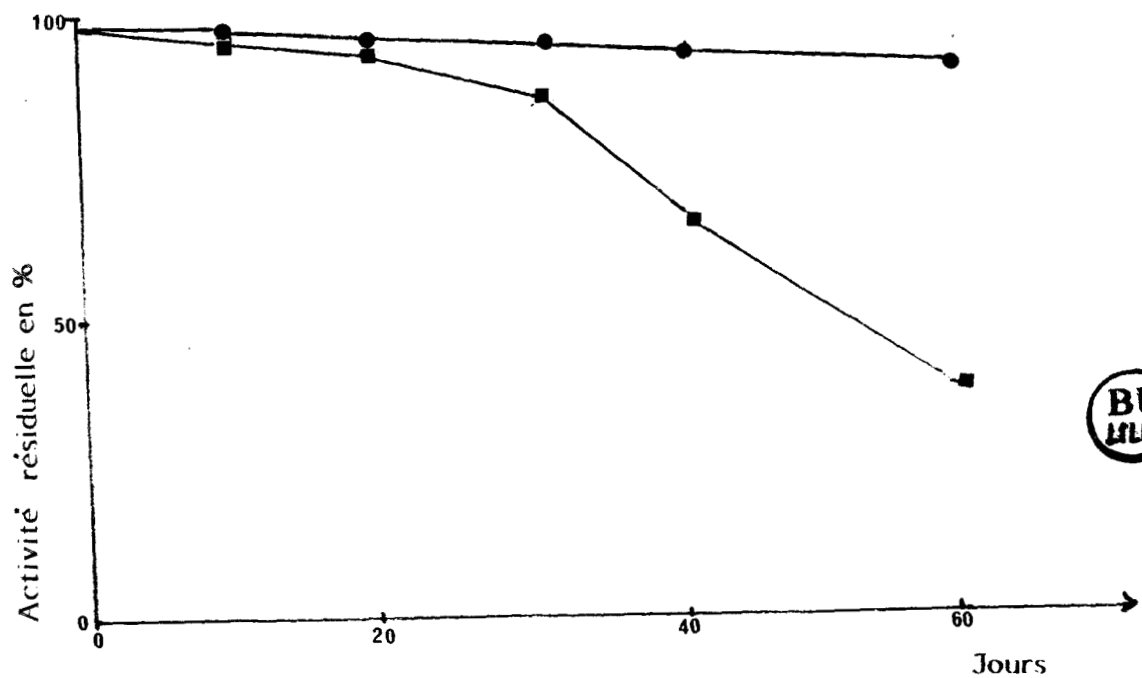


FIGURE 34 : Stabilité de l'activité enzymatique à basse température (l'activité est exprimée en % d'activité résiduelle). La protéine enzymatique est portée, pendant des durées variables, à + 4° C, avec (●) et sans (■) glycérol. Le substrat utilisé est le saccharose.



### b) Stabilité aux températures élevées :

Les extraits protéiques enzymatiques sont portés à des températures de 50° C, 60° C, 65° C et 70° C pendant des durées variables, puis sont refroidis rapidement dans la glace avant d'effectuer les mesures de l'activité enzymatique.

La FIGURE 35 représente l'effet de la dénaturation thermique en fonction du temps d'exposition. L'enzyme maintenue pendant 30 mn à 50° C conserve pratiquement toute son activité ; portée à 60° C, elle perd près de 50 % ; à 70° C, la protéine est rapidement dénaturée. Nous observons que l'influence de la dénaturation est plus faible lorsque le substrat est le raffinose ou le saccharose. Les constantes de l'inactivation thermique ( $K_i$ ) obtenues par la méthode d'Arrhenius (FIGURE 36) ont permis de calculer les énergies d'activations apparentes (E.a.) déterminées d'après la formule :

$$E.a = 1,93 \times 2,3 \text{ Log } \frac{K_2}{K_1} \times \frac{T_1 \times T_2}{T_2 - T_1}$$

Ces énergies sont de 9 KCal/mole quand le substrat est l'inuline, 12 KCal/mole quand le substrat est le raffinose et 15 KCal/mole quand le substrat est le saccharose, avec  $Q_{10} = 1,6$ .

Ces énergies sont faibles par rapport à celles trouvées par GUIRAUD (1981) chez les levures (E.a > 30 KCal/mole). Par contre, METREBERG (1964) indique une énergie d'activation de 10,8 KCal/mole pour l'hydrolyse de saccharose par l'invertase purifiée de *Saccharomyces* et de *Neurospora crassa*.

### 3. ACTION DES EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'action de divers inhibiteurs sur l'aptitude à hydrolyser les trois substrats a été étudiée (TABLEAU 17) ; le but de cette manipulation est plus la comparaison de l'action des inhibiteurs sur l'activité vis-à-vis des trois substrats, que la mise en évidence des groupements intervenant dans le site actif. Nous avons toutefois choisi, à côté de quelques métaux lourds, des inhibiteurs actifs sur divers résidus protéiques (FIGURE 37).

- Les cations monovalents ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) sont sans action sur l'activité enzymatique.
- $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$  sont des activateurs ; ils augmentent légèrement la vitesse de la réaction enzymatique.
- Les autres cations bivalents sont fortement inhibiteurs à une concentration supérieure à  $10^{-3}$  M.

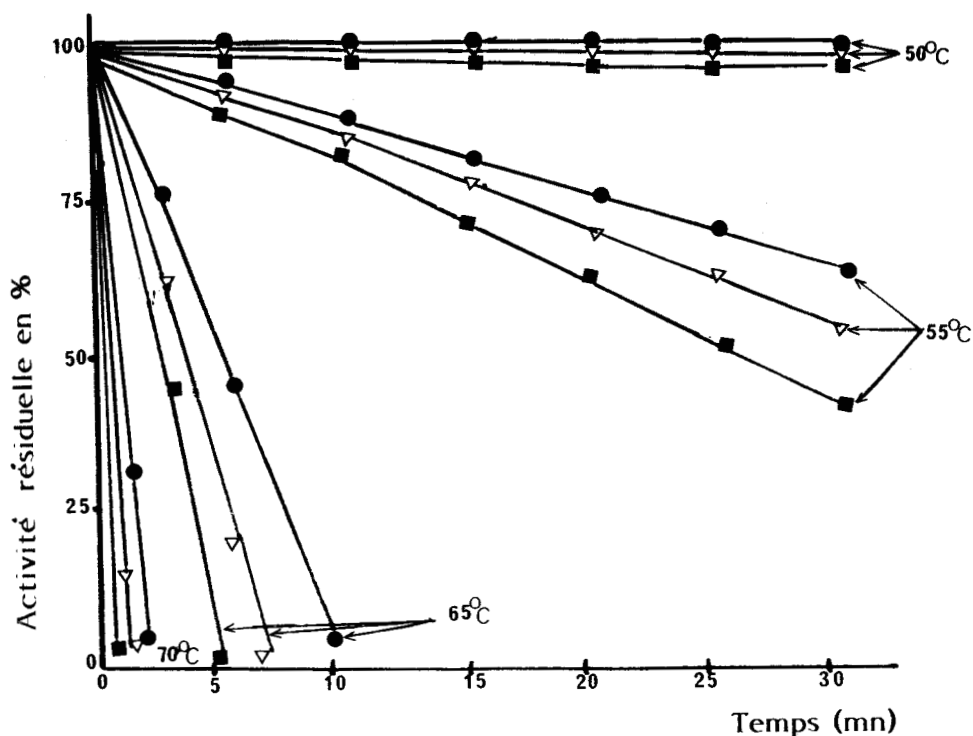


FIGURE 35 : Influence du traitement thermique sur l'activité enzymatique (exprimée en % d'activité résiduelle).

(■) Inuline ; (▽) Raffinose ; (●) Saccharose

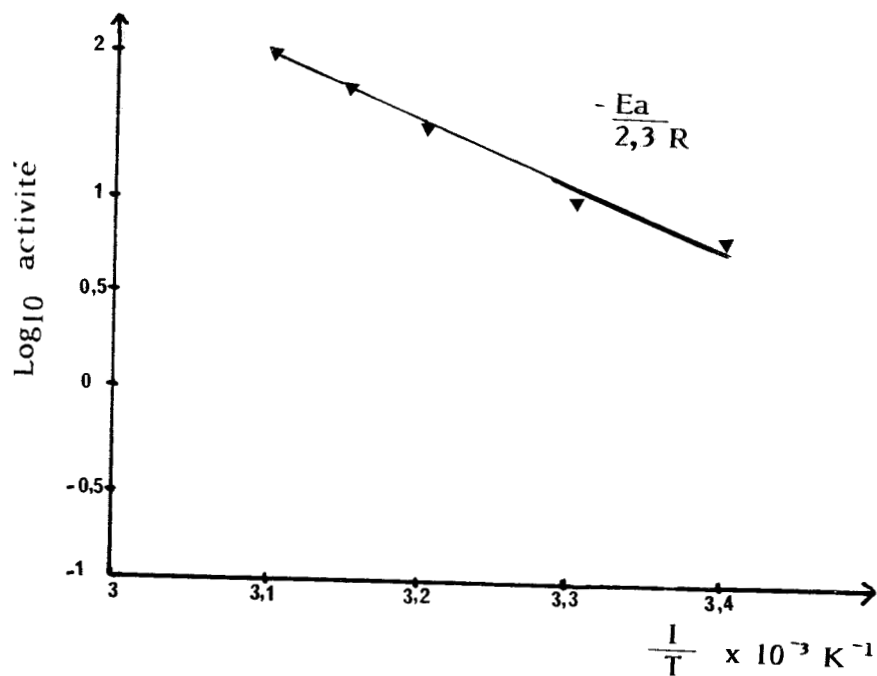


FIGURE 36 : Influence de la température sur l'activité enzymatique (représentation d'Arrhénus), les températures sont exprimées en °K. Le substrat est l'inuline.

Substrats :	Saccharose		Raffinose		Inuline	
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>
KCl	100	100	100	100	100	100
NaCl	100	100	100	100	100	100
NH <sub>4</sub> Cl	100	100	100	100	100	100
CoCl <sub>2</sub>	106	110	100	100	100	100
MgSO <sub>4</sub>	107	115	110	110	100	100
ZnCl <sub>2</sub>	25	57	20	52	8	44
MnCl <sub>2</sub>	98	100	93	100	88	100
Sn Cl <sub>2</sub>	100	100	100	100	100	100
CaCl <sub>2</sub>	100	100	100	100	98	100
FeCl <sub>2</sub>	52	98	44,5	93	22,3	88
AgNO <sub>3</sub>	00	40	00	33	00	23
HgCl <sub>2</sub>	00	83	00	68	00	78
CuCl <sub>2</sub>	00	93	00	85	00	88
I <sub>2</sub>	21	98	00	92,5	00	87,3
Pyridoxal	100	100	100	100	100	100
Acrylonitrile	92	100	80	100	77	100
N.B.S.	36	93	25	90	80	23
Anhydride acétique	90	100	83	100	77	100
Malonitrile	100	100	100	100	100	100
Diacetylye	100	100	100	100	90	100
N.E.M.	00	25	00	12	00	8
Iodo-acétate	00	65	00	42	00	28
P.hydroxymercurobenzoate	00	52	00	43	00	33
E.D.T.A.	100	100	100	100	100	100



TABLEAU 17 : Action des inhibiteurs sur l'activité enzymatique (exprimée en % d'activité relative).

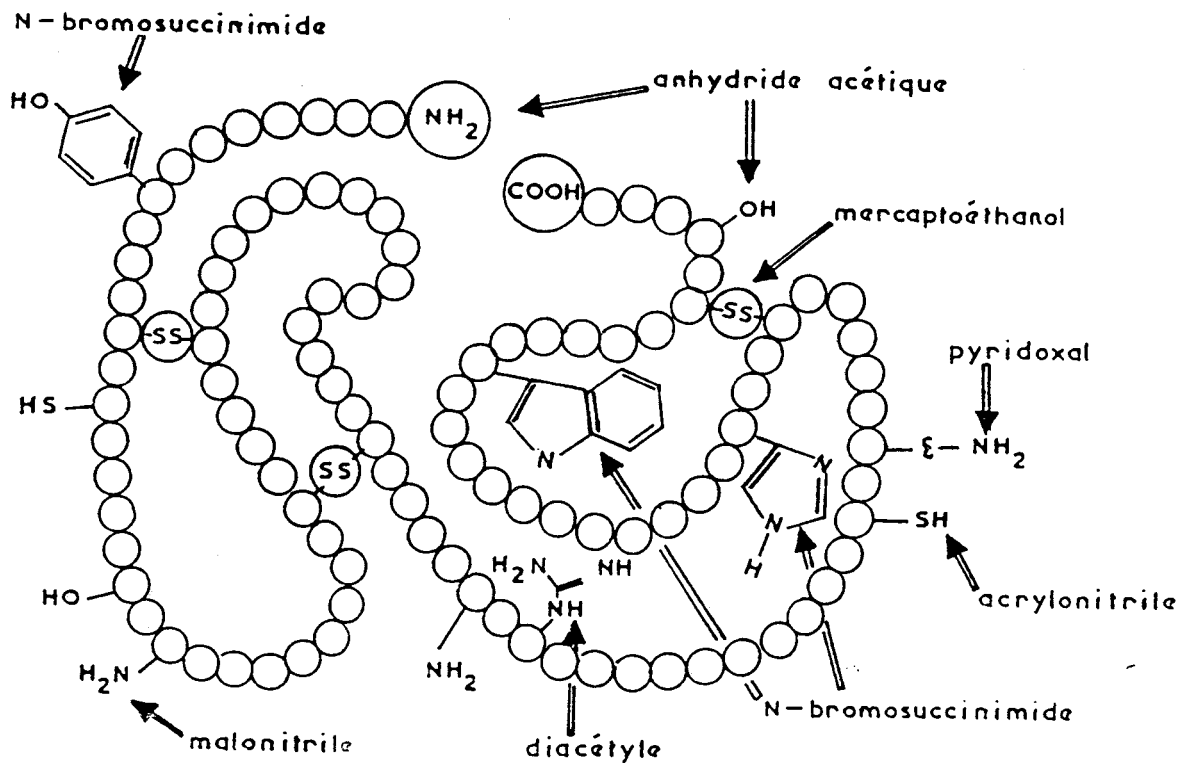


FIGURE 37 : Point d'impact des inhibiteurs utilisés sur une molécule d'enzyme.



Les ponts disulfures se réduisent facilement en thiols (- SH) avec bien souvent perte de l'activité enzymatique. Tout composé réagissant avec les groupements - SH sera un inhibiteur potentiel ; tel est le cas de l'iodoacétate, le N.E.M., le P-hydroxy-mercuro-benzoate et les métaux lourds ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ).

Le N-bromosuccinimide (N.B.S.) est un composé agissant sur le groupement cyclique des acides aminés. Nous constatons que les divers inhibiteurs ont une action sur l'activité enzymatique vis-à-vis des 3 substrats ; cependant, l'action inhibitrice est un peu plus importante sur l'inuline qu'en présence de raffinose et de saccharose.

#### 4. MODE D'ACTION DE L'ENZYME

Cette étude a été effectuée en présence d'une solution d'inuline à 2,5 % et une solution de raffinose à 3 %. Dans 100 ml de chaque solution est ajouté l'extrait enzymatique à raison de 2 U.I./ml ; la réaction est réalisée au bain-marie à 40° C et à pH 6, sous agitations ; des prélèvements sont effectués régulièrement. La cinétique d'hydrolyse a été suivie par H.P.L.C. et par dosage des sucres réducteurs.

L'analyse en H.P.L.C. et le dosage spécifique du glucose et fructose ont été effectués au cours de l'hydrolyse de l'inuline [FIGURE 38 (a)]. Le fructose apparaît régulièrement au cours du temps et sa cinétique d'apparition correspond à celle du sucre réducteur ; le glucose apparaît tardivement. Par ailleurs, l'hydrolyse de raffinose se traduit par la libération du fructose avec une accumulation de mélibiose [FIGURE 38 (b)].

Ces résultats montrent que l'enzyme est une  $\beta$  fructofuranosidase qui libère du fructose et qui laisse subsister un résidu non réducteur.

#### 5. DETERMINATION DES CONSTANTES DE MICHAELIS (FIGURE 39 )

La détermination des constantes de Michaelis pour les trois substrats par la méthode lineweaver a donné les résultats suivants :

- Inuline :  $K_m = 0,25 \cdot 10^{-2}$  Molaire avec vitesse maximale de 9  $\mu\text{mole}/\text{mn.mg}$
- Raffinose :  $K_m = 4 \cdot 10^{-2}$  Molaire avec vitesse maximale de 12  $\mu\text{mole}/\text{mn.mg}$
- Saccharose :  $K_m = 1,2 \cdot 10^{-2}$  Molaire avec vitesse maximale de 30  $\mu\text{mole}/\text{mn.mg}$ .

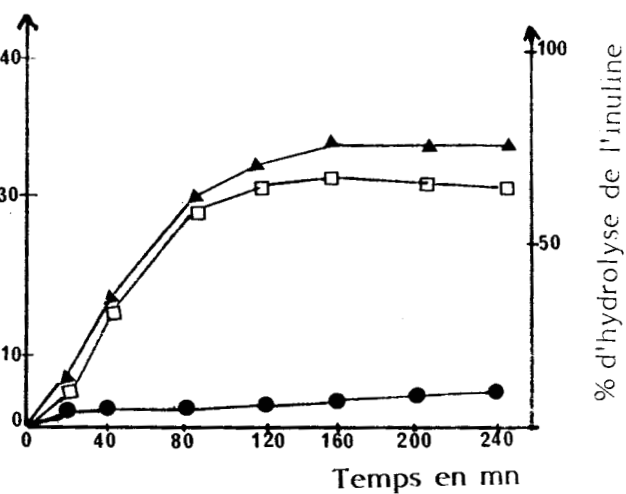


FIGURE 38 (a) :  
Cinétique d'apparition des sucres réducteurs en fonction du temps au cours de l'hydrolyse de l'inuline.  
(▲) sucres réducteurs  
(□) fructose libéré  
(●) glucose libéré

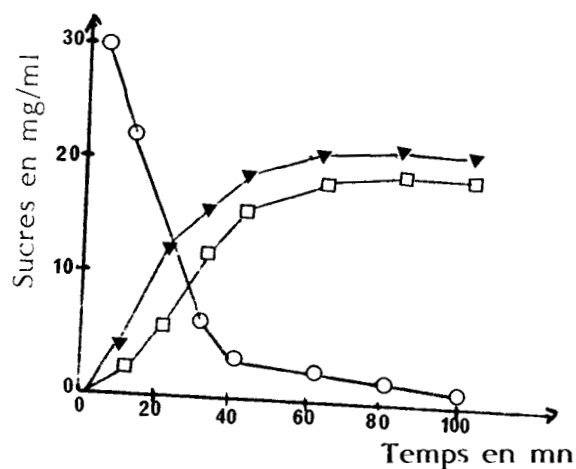


FIGURE 38 (b) :  
Hydrolyse du raffinose en fonction du temps.  
(○) raffinose : gal  $\xrightarrow{\alpha 1,6}$  gluc  $\xrightarrow{\beta 2,1}$  fruc  
(▼) melibiose : gal  $\xrightarrow{\alpha 1,6}$  gluc  
(□) fructose





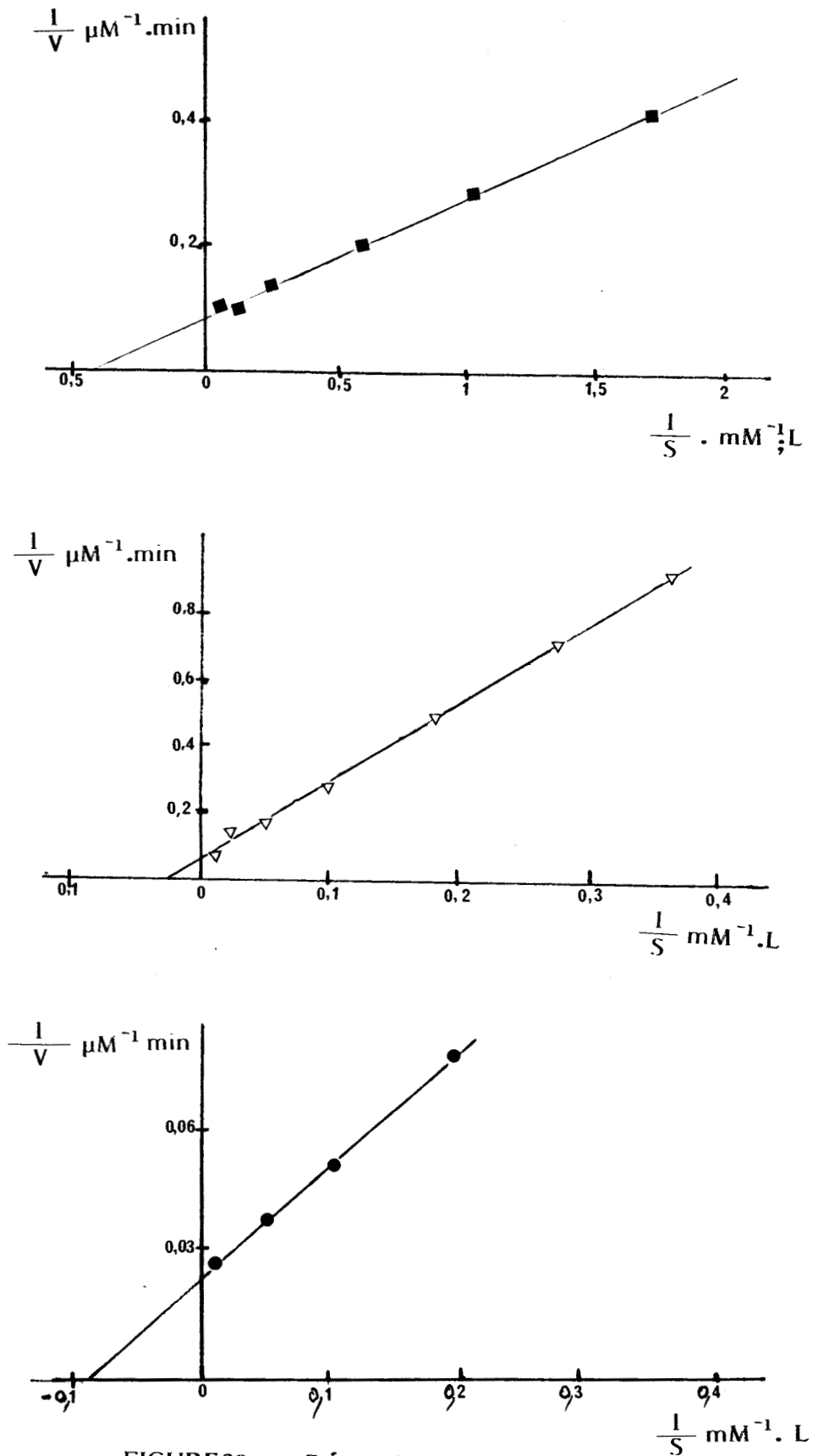


FIGURE 39 : Détermination des  $K_m$  de l'enzyme.

- (■) le substrat est l'inuline
- (▽) le substrat est le raffinose
- (●) le substrat est le saccharose

## CHAPITRE VI

### Structure de l'enzyme purifiée

— o o o —

## 1. DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

Nous avons tenté de déterminer la masse moléculaire (M.M) de l'enzyme purifiée par deux techniques : la filtration moléculaire sur gel de Sepharose 6B et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à différentes concentrations d'après la méthode de HEDRICK et SMITH (1968).

### 1.1 - Filtration sur gel de Sepharose 6B

La détermination de la M.M est effectuée sur un extrait purifié par chromatographie sur ultrogel A.C.A. 34.

L'extrait est ensuite concentré dans un tube de dialyse immergé dans du polyéthylène glycol, puis dialysé contre de l'eau distillée. La position de l'enzyme par rapport aux autres protéines témoins à la sortie de la colonne de Sepharose 6B indique une valeur de 130 000 (FIGURE 40 ).

### 1.2 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les électrophorèses ont été réalisées dans des gels à des concentrations de 3, 4, 5, 6, 7 % en Acrylamide; nous avons utilisé comme témoin la catalase (M.M 240 000) et la ferritine (M.M 480 000). La M.M estimée de notre enzyme est de 127 000 ; cette valeur ainsi obtenue concorde avec celle déterminée par filtration (FIGURE 41 ).

## 2. MASSE MOLECULAIRE DES SOUS-UNITES

Les masses moléculaires des sous-unités de l'enzyme sont déterminées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en S.D.S., selon la méthode décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes. Dans le gel à 8 % d'acrylamide, la M.M de la sous-unité la plus importante se situe aux environs de 65 000 (FIGURE 42 ). Ce qui suggère la présence de deux sous-unités.

## 3. RECHERCHE D'UN GROUPEMENT PROSTHETIQUE

L'activité catalytique de l'enzyme mesurée par la libération du fructose n'est pas modifiée par dialyse prolongée, même en présence d'un agent complexant tel que l'éthylène-diamine-tetraacétate de sodium 1 mM, ce qui exclut l'existence d'un cofacteur dissociable masqué ou non par un métal.

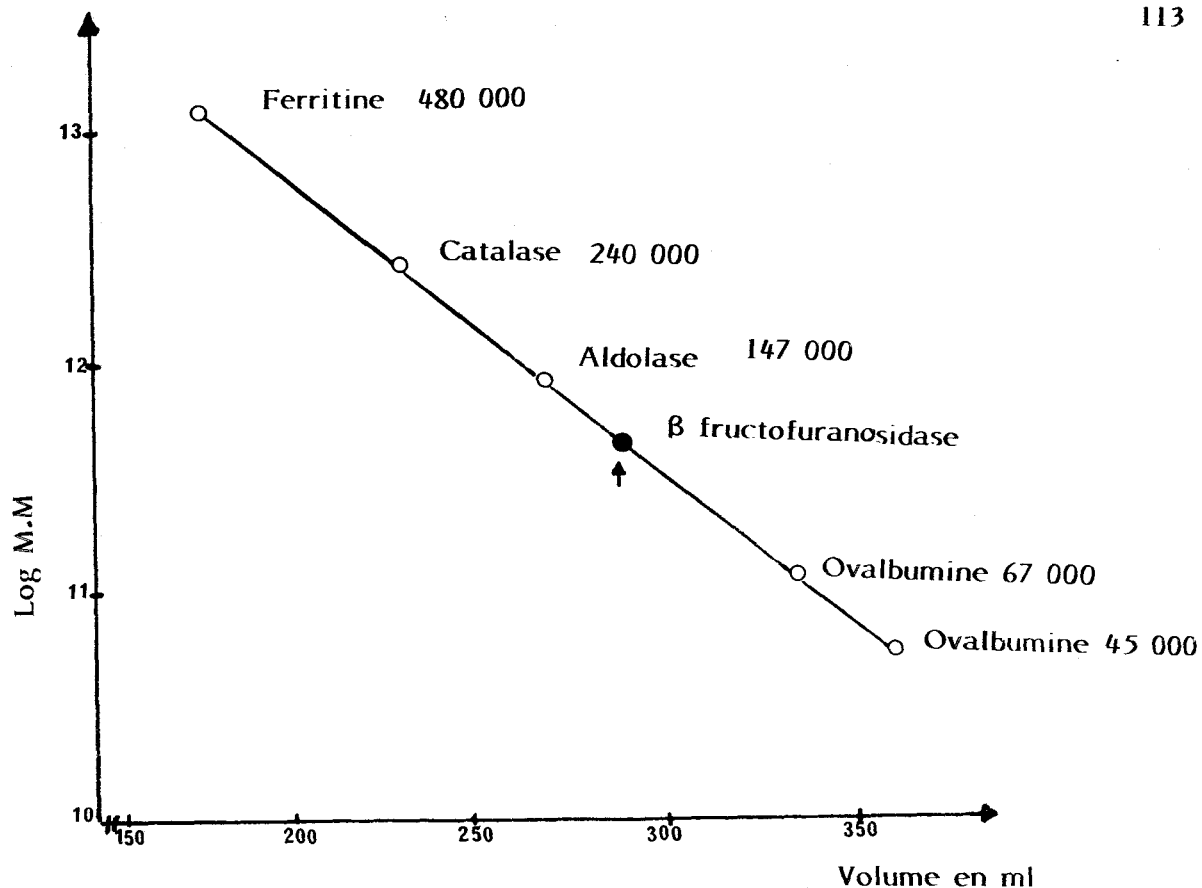


FIGURE 40 : Détermination de la M.M de la  $\beta$  fructofuranosidase par filtration sur gel de sépharose 6 B.

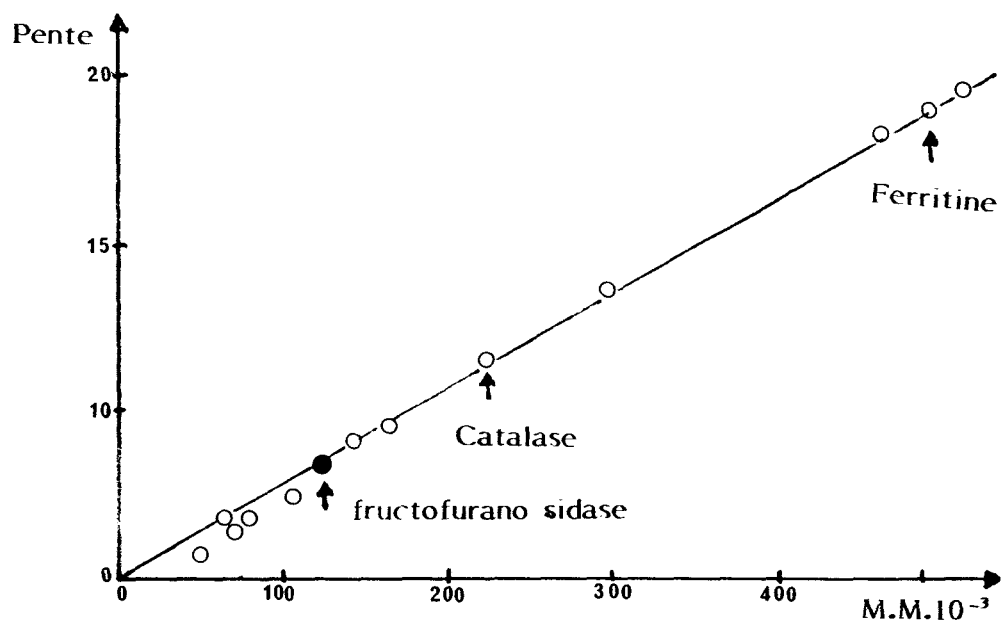


FIGURE 41 : Détermination de la M.M de l'enzyme en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à différentes concentrations d'acrylamide selon la méthode HEDRICK et SMITH (1968).



#### 4. RECHERCHE DES SUCRES DANS LA PREPARATION ENZYMATIQUE PURIFIEE

Un certain nombre de transférases agissant sur les oses contiennent des quantités importantes de sucres ; c'est le cas de l'invertase de levure qui renferme 70 % de polysaccharide (**FISCHER, KOHTES et FLEMING, 1951**), de l'invertase de *Neurospora crassa* (**METZENBERG, 1963**) qui est contaminée par une hexosamine (2 %), de l'hexokinase cristallisée de levure qui contient 50 % de mannose (**BOSER, 1955**), et également de la  $\beta$  galactosidase (**WALLENFELS, 1950**).

Lors de la purification de notre enzyme par chromatographie d'affinité (conA - Sepharose 4B), nous avons pu obtenir la fixation de l'enzyme sur le conA . Cette dernière se combine avec les molécules qui comportent des résidus  $\alpha$  D mannopyranosyl et  $\alpha$  D glycopyranosyl, donc un absorbant spécifique des polysaccharides, des glycoprotéines et des glycolipides. Par ailleurs, nous avons cherché la présence d'aldose dans l'enzyme purifiée par la méthode de **WINGLER** modifiée par **FRANCOIS et COLL. (1962)** qui révèle la présence d'hexose dans la molécule de l'enzyme. Par conséquent, notre  $\beta$  fructofuranosidase est probablement une glycoprotéine, mais une étude plus approfondie serait souhaitable.

#### 5. COMPOSITION QUALITATIVE EN ACIDES AMINES

Un certain nombre de transosylases ont été obtenus à l'état pur et leur composition en amino-acides a été déterminée ; c'est le cas notamment de la phosphorylase (**VELIK et WICKS, 1951**), de l' $\alpha$  amylase de diverses origines (**FISCHER, 1964**) et de la  $\beta$  galactosidase d'*E. coli* (**WALLENFELS, 1950**).

L'analyse qualitative des acides aminés de notre enzyme réalisée après hydrolyse totale (HCl 6 N, 100° C), suivie d'une électrophorèse des acides aminés, montre la composition en acide aminés indiquée ci-dessous.

- |              |                 |
|--------------|-----------------|
| - Asparagine | - Cystine       |
| - Threonine  | - Leucine       |
| - Serine     | - Isoleucine    |
| - Glutamine  | - Tyrosine      |
| - Proline    | - Phenylalanine |
| - Glycine    | - Lysine        |
| - Alanine    | - Histidine     |
| - Methionine | - Arginine      |
| - Valine     | - Tryptophane   |

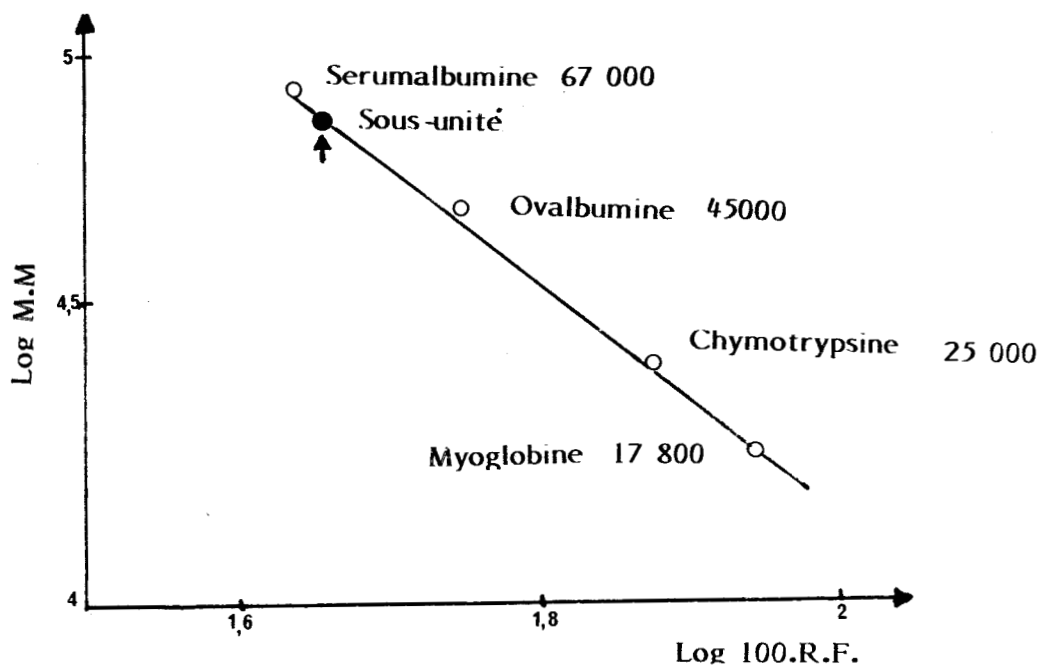


FIGURE 42 : Détermination de la masse moléculaire des sous-unités de la  $\beta$  fructofuranosidase.

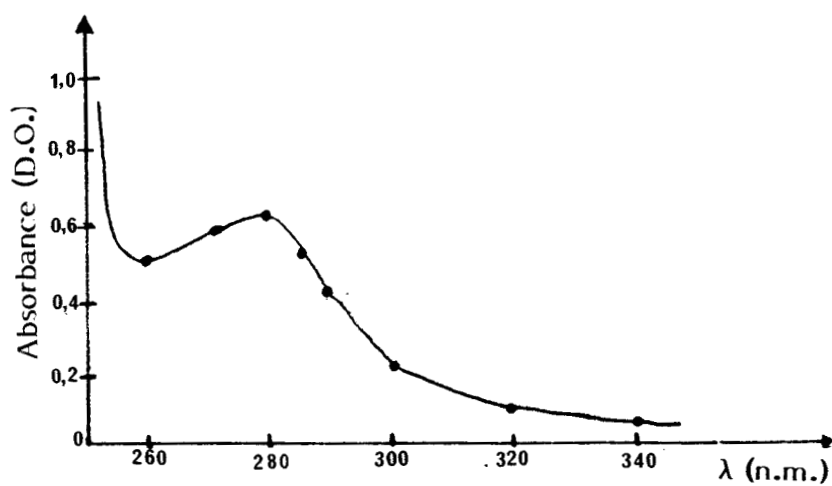


FIGURE 43 : Spectre d'absorption de l'enzyme purifiée (0,1 mg/ml) en solution dans un tampon phosphate 0,1 M, pH = 7.



Par ailleurs, le spectre d'absorption en ultraviolet de l'enzyme purifiée à pH 7 présente un minimum à 260 nm et un maximum à 278 nm (FIGURE 43 ).

Le rapport  $\frac{\text{Abs } 280}{\text{Abs } 260}$  est de 1,2.

L'absorption maximale à 278 nm suggère la présence d'acides aminés aromatiques. Nous avons ensuite obtenu une valeur du point isoélectrique de l'enzyme au-dessous de pH 4, ce qui laisse penser qu'il y a une forte proportion d'acides aminés diacides.

## 6. ETUDE DES GROUPEMENTS INTERVENANT DANS L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'étude des groupements qui interviennent dans l'activité enzymatique a débuté par l'observation des courbes d'activité en fonction du pH ; les valeurs du pH correspondant aux points d'inflexions de telles courbes ont fourni très tôt des indications intéressantes sur la nature des groupes impliqués dans le site actif.

Actuellement, cette étude couvre un domaine extrêmement vaste ; elle peut être abordée par l'emploi de méthodes physiques (spectre ultraviolet, de dispersion rotatoire optique de R.M.N. ou par l'utilisation de réactifs spécifiques d'acides-amino en passant par l'étude *in vivo* de la cellule productrice de l'enzyme (remplacement des amino-acides par des analogues). Pour des raisons purement techniques, nous nous sommes limités à l'étude de l'influence du pH sur les constantes de la réaction.

Sur notre  $\beta$  fructofuranosidase, nous avons suivi la variation de la vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) et des constantes d'affinités pour le saccharose ( $K_s$ ) et l'inuline ( $K_i$ ) en fonction du pH.

Les valeurs de pK des acides aminés susceptibles d'intervenir dans l'activité d'une protéine enzymatique sont rappelées ci-dessous (DIXON et WEBB, 1964) (TABLEAU 18 ).

D'après KOSLAND (1960) un pK situé aux environs du pH 4 correspond à un groupement carboxyl, situé aux environs du pH 6,5 ; il correspond vraisemblablement à un groupement imidazole.

Nous avons déterminé la constante de Michaelis et Menten pour chaque valeur du pH en suivant la cinétique de libération des sucres réducteurs, ceci à partir de 4 concentrations en saccharose : 0,0125 M, 0,025 M, 0,075 M et 0,1 M. Pour les pH compris entre 4 et 7, nous avons utilisé un tampon phosphate disodique-acide acétique, entre pH 6 et 9 : un tampon phosphate avec des concentrations de 0,02 M.

GROUPEMENT	pK
Carboxyl ( $\alpha$ )	3,0 - 3,2
Carboxyl (aspartyl)	3,0 - 4,7
Carboxyl (glutamyl)	- - 4,4
Hydroxyl phenolique	9,8 - 10,4
Sulphydryl	8,3 - 8,6
Imidazol (histidine)	5,6 - 7,0
$\alpha'$ aminé	7,6 - 8,4
$\alpha$ aminé (Cystine)	6,5 - 8,5
$\epsilon$ aminé (lysine)	9,4 - 10,6
Guanidinyl (arginine)	11,6 - 12,6



**TABLEAU 18 : Valeurs de pK des acides aminés susceptibles d'intervenir dans l'activité d'une protéine enzymatique.**



Le calcul de la vitesse maximale a été directement effectué à l'aide des courbes de Lineweaver et Burk. Nous avons mesuré l'activité enzymatique aux différents pH au cours d'une seule et même expérience. Les variations de  $K_m$  et  $V_m$  sont exprimées dans la FIGURE 44. Nous constatons que le pH optimum est situé aux environs de 6, ce qui confirme la valeur précédemment trouvée avec la préparation partiellement purifiée. La diminution d'activité au-dessus du pH 6 n'est pas due à une dénaturation de l'enzyme du moins jusqu'à pH 9 car l'activité est entièrement récupérée lorsqu'on ramène l'enzyme par dialyse de pH 9 à pH 6. Au-delà de pH 9, une dénaturation de l'enzyme se produit. Au pH optimum, la valeur du  $K_m$  est de  $1,6 \cdot 10^{-2}$  M, ce qui concorde bien avec les résultats trouvés précédemment ( $1,2 \cdot 10^{-2}$  M). Nous avons utilisé la représentation de **DIXON (1953)** pour déterminer de façon plus précise, à partir des courbes  $K_m$  et  $V_m$ , le p $K_m$  des groupes intervenant dans l'activité enzymatique. Sur les courbes de  $\text{Log}V_{\text{max}}$  et p $K_m$  en fonction du pH (FIGURE 45), nous trouvons un p $K_1$  entre 4,5 et 5 et p $K_2$  entre 6,5 et 7,5. La variation de la constante d'affinité  $K_i$  de l'enzyme pour l'inuline en fonction du pH a été également suivie. Les résultats sont conformes à ceux trouvés précédemment.

De ces travaux, nous pouvons déduire qu'il y a probablement un groupe carboxyl ou un groupe imidazol (ou  $\alpha$  aminé) ou les deux à la fois, qui intervient dans l'activité enzymatique.

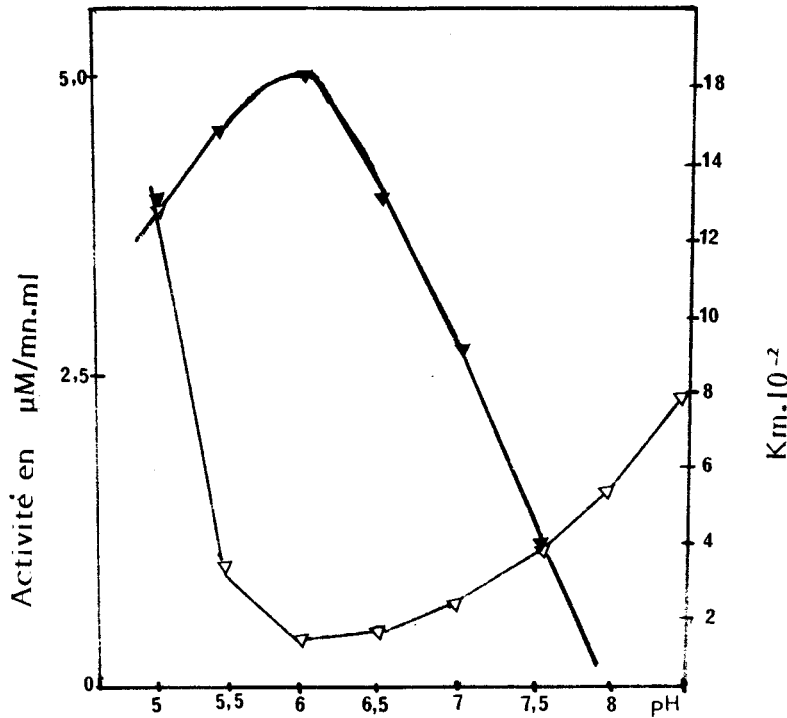


FIGURE 44 : Effet du pH sur la constante d'affinité  $K_m$  ( $\nabla$ ) et la vitesse maximum ( $V_{\max}$ ) pour le saccharose ( $\blacktriangledown$ )

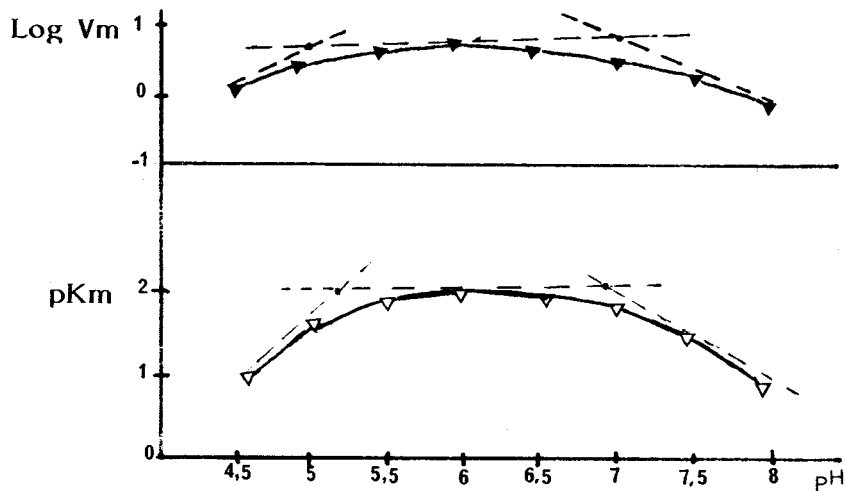


FIGURE 45 : Effet du pH sur la vitesse maximum et la constante d'affinité de la  $\beta$  fructofuranosidase pour le saccharose. Représentation selon DIXON (1953).



## CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons utilisé des méthodes simples de purification de la  $\beta$  fructofuranosidase de la souche isolée et étudié quelques unes de ses propriétés. La pureté de notre préparation étudiée par chromatographie d'échange d'ions, gel de filtration, chromatographie d'affinité et électrophorèse, nous semble satisfaisante.

L'activité  $\beta$  fructofuranosidasique de la souche retenue dépend de la présence d'une seule enzyme, comme pour les levures, telles *K. fragilis* et *Candida kefyr*.

La préparation enzymatique obtenue dégrade l'inuline en libérant du fructose et un résidu non réducteur ; elle est active également sur le saccharose et le raffinose. Il s'agit donc d'une inulinase de type  $\beta$  fructofuranosidase.

Le rapport inuline/saccharose ( $\frac{I}{S}$ ) obtenu est élevé, de l'ordre de 0,2, ce qui différencie toutefois cette enzyme des invertases classiques comme celle de *Saccharomyces cerevisiae*. On peut cependant admettre que ces inulinases ne sont que des invertases ayant des propriétés particulières puisqu'elles jouent le rôle d'invertase. La  $\beta$  fructofuranosidase étudiée, tout comme celle de *Candida kefyr* (NEGORO et KITO, 1973 b) et de *K. fragilis* (NEGORO, 1978) est une glycoprotéine, ce qui est également le cas des invertases (NEUMAN et LAMPEN, 1967 ; IIZUKA et COLL., 1977). La plupart des carbohydratases sont des glycoprotéines (PAZUR et COLL., 1963).

Si l'on examine les propriétés de l'enzyme isolée, nous pouvons faire les observations suivantes :

- L'enzyme reste généralement active à des pH supérieurs à 4,5 ; elle est inactivée à pH très acide. Le pH optimum est de l'ordre de 6 pour les trois substrats : inuline, raffinose et saccharose. Ce pH optimum est voisin de ceux observés chez les bactéries productrices d' $\alpha$ -amylase telles que *Bacillus subtilis* (GREENWOOD, 1968) ou *Bacillus licheniformis* (THIRUNA, 1984). Le pH optimum des inulinases de levures est souvent inférieur à 5.

- La température optimale d'activité varie entre 45° C et 50° C, est légèrement plus faible que celle de *K. fragilis* qui se situe à 55° C (NEGORO, 1978). L'enzyme est stable aux alentours de la température optimale (50° C), mais elle est plus ou moins sensible aux fortes températures et se dénature rapidement à 70° C. Cependant un comportement particulier, d'ailleurs décrit chez plusieurs levures, telles que *K. fragilis* (NAHM et BYUN, 1977) a été mis en évidence pour la souche étudiée : la dénaturation thermique a des conséquences variables selon le substrat. La baisse d'activité par dénaturation thermique est toujours plus importante avec l'inuline qu'avec le raffinose et surtout le saccharose, comme le montrent les valeurs d'énergie d'activation obtenues pour chacun de ces substrats. Ce fait peut être expliqué par la dénaturation progressive de l'enzyme et de son site actif sous l'influence de la température, la dénaturation ayant des conséquences variables selon le substrat en raison de son encombrement stérique. L'accès de l'inuline dont la taille est importante, doit être gêné plus facilement que celui du saccharose.

- L'étude de l'influence de divers inhibiteurs a montré que le comportement était pratiquement identique sur les différents substrats.

- Les cations monovalents sont sans action sur l'activité enzymatique.

-  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  augmente la vitesse de la réaction ; ce sont des activateurs. Les autres cations bivalents inhibent l'activité enzymatique à des concentrations supérieures à  $10^{-3}$  M.

- Les sels des métaux lourds ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ) inhibent fortement l'activité enzymatique.

- L'inhibition par le N.E.M. et le P-hydroxymercubenzoate, ou l'iode-acétate, indique la présence du groupement thiol dans le site actif de l'enzyme.

- Les constantes de Michaelis de notre enzyme sont de  $0,25 \cdot 10^{-2}$  M pour l'inuline,  $1,25 \cdot 10^{-2}$  M pour le saccharose et  $4 \cdot 10^{-2}$  M pour le raffinose. Ces valeurs sont voisines de celles trouvées chez la plupart des levures, alors

que celles des champignons sont en général plus faibles et présentent une meilleure affinité : c'est le cas d'*Aspergillus niger* (NAKUMARA, 1978) dont le  $K_m$  est de l'ordre de  $10^{-3}$ . Rappelons que la constante de Michaelis de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* pour le saccharose est de  $2 \cdot 10^{-2}$  M, valeur voisine de celle que nous avons trouvée et aussi de celle de l'inulinase du topinambour ( $K_m \approx 10^{-2}$  M).

- La  $\beta$  fructofuranosidase possède une masse moléculaire (M.M) de l'ordre de 130 000. L'activité spécifique peut être de 220 moles d'inuline transformées par minute et par mole d'enzyme.

Comme pour la plupart des saccharases, l'enzyme possède un pH optimum acide (pH 6) et 2 pK, l'un à 4,5 - 5 et l'autre à 7 - 7,5. Un groupe carboxyl, ou un groupe imidazole, ou  $\alpha$  aminé, ou les deux, interviennent probablement dans l'activité enzymatique.

## CHAPITRE VII

### Régulation de la biosynthèse de la $\beta$ fructofuranosidase extracellulaire

— 0 0 0 —

## **I. ETUDE DE L'EFFET GLUCOSE SUR LA BIOSYNTHESE DE L'ENZYME**

### **1.1 - Effet du glucose en présence des différents $\beta$ fructosides**

Nous avons montré, dans le Chapitre II, que la biosynthèse de la  $\beta$  fructofuranosidase semble être fortement induite par la présence d'inuline et à moindre degré, par la présence des autres  $\beta$  fructosides, alors que la présence du glucose réprime l'activité enzymatique au cours de la croissance.

Afin de bien déterminer le rôle du glucose, nous avons effectué une série de cultures contenant divers  $\beta$  fructosides (inuline, raffinose, saccharose) en présence du glucose. Les cultures ont été effectuées dans le milieu synthétique renfermant, en plus du substrat carboné à tester à la concentration de 0,5 %, du glucose de 0,2 %. Nous avons suivi l'apparition de l'enzyme en présence et en absence de glucose pour les trois substrats. La FIGURE 46 rapporte les résultats obtenus : nous constatons que, quelque soit le substrat utilisé, la présence du glucose bloque totalement l'apparition de l'activité enzymatique.

### **1.2 - Effet du glucose dans différentes conditions en présence d'inuline**

#### **1.2.1 - Effet du glucose à différentes concentrations**

Nous avons ensuite recherché la concentration limitante du glucose réprimant la biosynthèse de l'enzyme. La FIGURE 47 résume les résultats obtenus.

Nous constatons que, quelle que soit la concentration, le glucose bloque la biosynthèse de l'enzyme et ce n'est qu'après l'utilisation totale du glucose que la libération de l'enzyme s'effectue dans le milieu.

#### **1.2.2 - Effet du glucose ajouté en phase exponentielle de croissance**

Par ailleurs, pendant la phase exponentielle de la division cellulaire, lors de la biosynthèse intense de l'enzyme, nous avons additionné au milieu de culture une concentration de 0,2 % de glucose.

Dès l'addition du glucose (FIGURE 48), nous constatons un arrêt aussi bien de l'apparition de l'activité enzymatique que de l'hydrolyse de l'inuline. Parallèlement, la consommation de glucose par les cellules commence dès son addition dans le milieu de culture.

Ce test confirme l'effet inhibiteur du glucose.

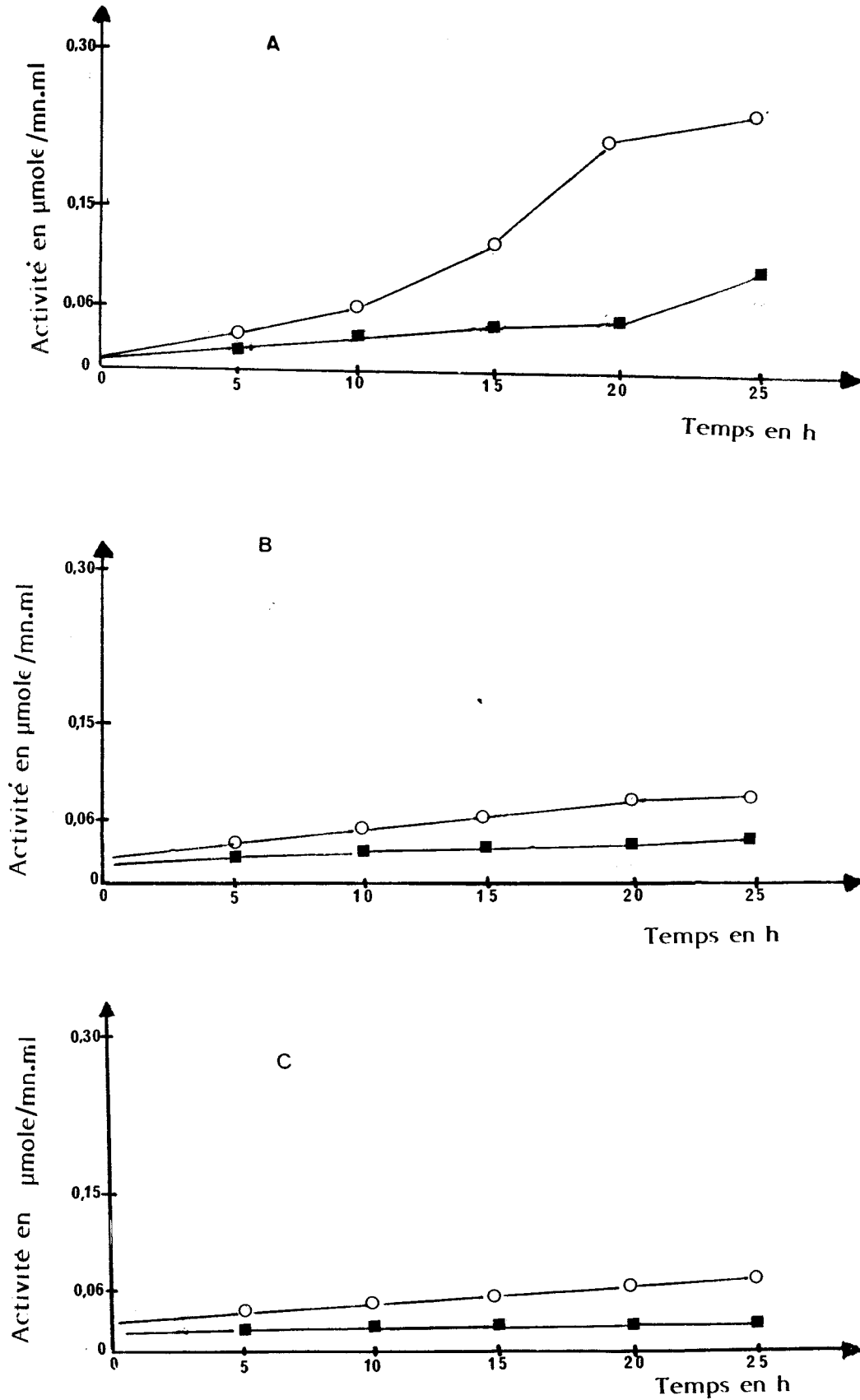


FIGURE 46 : Etude de l'apparition de l'activité enzymatique en présence :  
 ( A ) d'inuline ; ( B ) de raffinose ; ( C ) de saccharose, ( ■ ) avec  
 et ( O ) sans glucose.





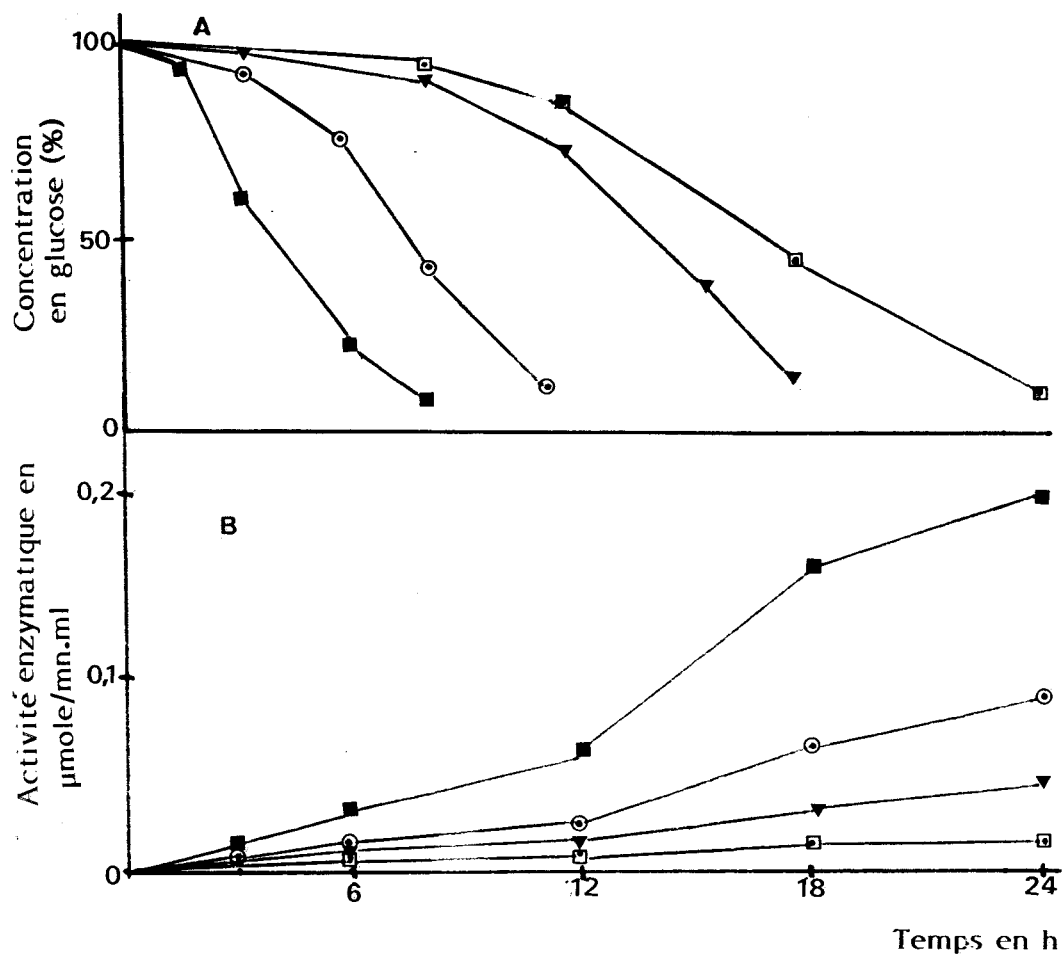


FIGURE 47 : Effet de la concentration de glucose sur l'apparition de l'activité enzymatique.

( A ) concentration de glucose exprimée en %

( B ) apparition de l'activité enzymatique

( ■ ) 0,05 % ; ( ⊙ ) 0,1 % ; ( ▼ ) 0,25 % ; ( □ ) 0,5 %

culture effectuée sur milieu synthétique contenant  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$  d'inuline, dans un Erlen-Meyer, à  $30^\circ \text{ C}$ , sous agitation, et à pH 7.



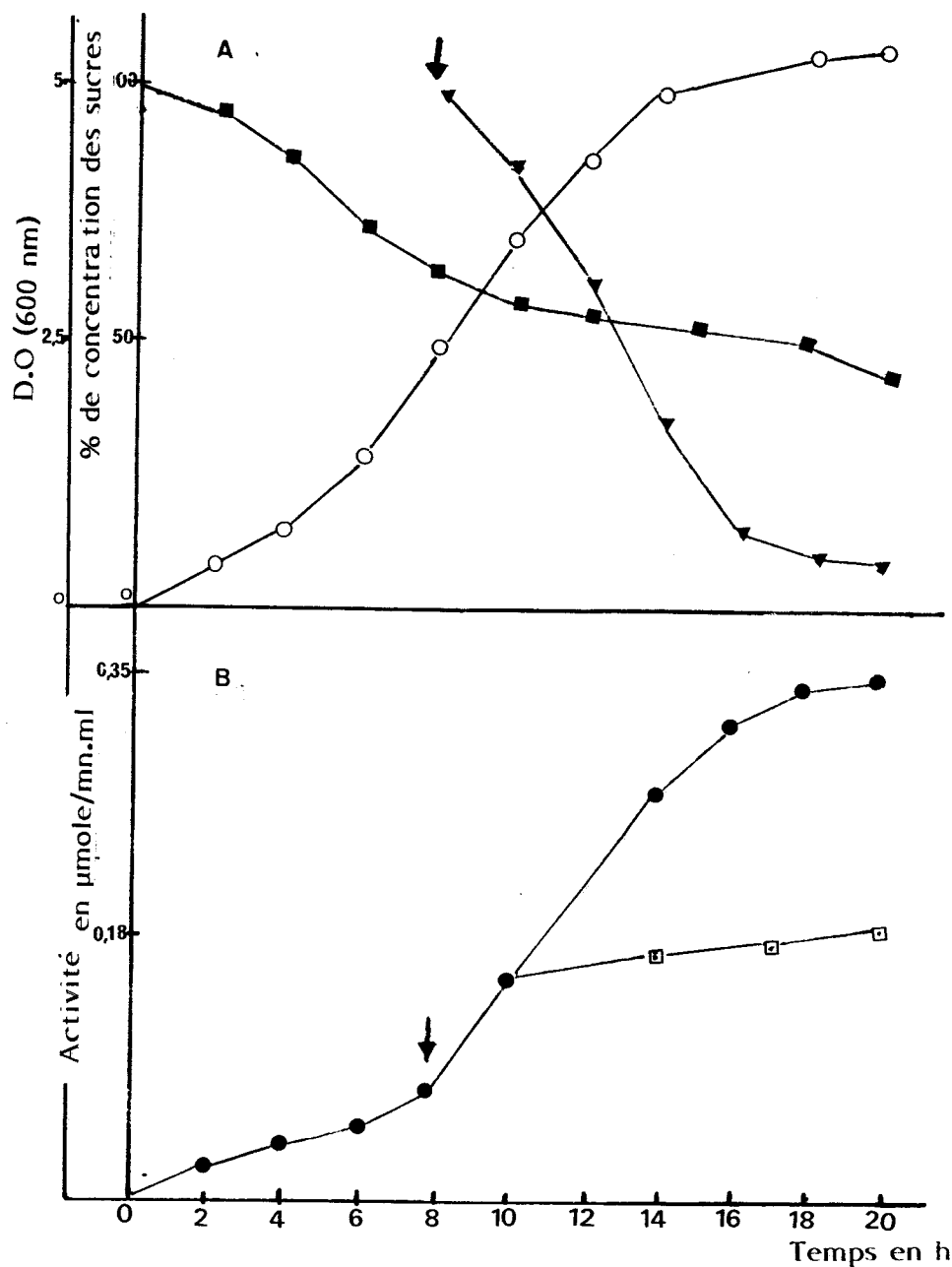


FIGURE 48 : Effet du glucose (0,2 %) additionné en phase exponentielle (↓) sur la biosynthèse de l'enzyme :

- A) (○) croissance bactérienne exprimée en D.O. à 600 nm  
 (■) concentration en inuline exprimée en % de consommation  
 (▽) concentration du glucose
- B) Biosynthèse de l'enzyme :  
 (●) témoin sans addition de glucose  
 (□) après addition de glucose



### 1.2.3 - Mise en évidence d'une diauxie

Cette étude est inspirée de travaux antérieurs effectués au laboratoire (THEODOROPOULOS, 1985). Pour obtenir une courbe diauxique, il faut que le glucose réprime la biosynthèse de l'enzyme, et l'inuline ne pourra pas être utilisée avant que le glucose ait disparu du milieu.

Dans la culture en fermenteur, en plus de l'appréciation de la consommation des substrats, le phénomène de diauxie est mis en évidence par la mesure de l'oxygène dissous dans le milieu de culture.

Nous avons réalisé des cultures de 3 l en fermenteur Setric avec un  $K_{La}$  de  $15 \text{ h}^{-1}$  obtenu par une aération constante de 2 l d'air/mn, avec une agitation de 50 r.p.m. La culture est réalisée sur milieu synthétique en présence de glucose (0,1 %) et d'inuline (0,5 %). Nous avons effectué des prélèvements à des moments précis de la croissance bactérienne afin de suivre l'évolution de la D.O., la consommation simultanée du glucose, de l'inuline et l'apparition de l'activité  $\beta$  fructofuranosidique.

La courbe diauxique se traduit par deux phases dans le suivi de l'oxygène dissous (FIGURE 49) :

- durant la première phase, le milieu reste saturé en oxygène, durant la phase exponentielle le taux de l'oxygène dissous diminue. Une fois le glucose consommé, le milieu se resature en oxygène.

- durant la deuxième phase, le taux d'oxygène diminue avec un début d'hydrolyse de l'inuline ; puis, en phase stationnaire, il y a à nouveau saturation.

Durant la première phase de croissance, la concentration d'inuline dans le milieu reste inchangée et l'activité enzymatique reste faible ou quasi nulle ; elle est comparable à celle observée en présence de glucose seul. Par contre, à partir du début de la phase stationnaire intermédiaire et durant la seconde phase de croissance, la consommation du glucose est totale, alors que la concentration en inuline diminue dans le milieu et s'accompagne d'une augmentation importante de l'activité enzymatique.

### 1.3 - Discussion

Les résultats obtenus montrent que le glucose exerce une répression de la biosynthèse de l'enzyme ; en effet, quelle que soit la concentration en glucose, la seule présence du produit dans la solution bloque totalement l'apparition de l'activité enzymatique et ce n'est qu'après son utilisation

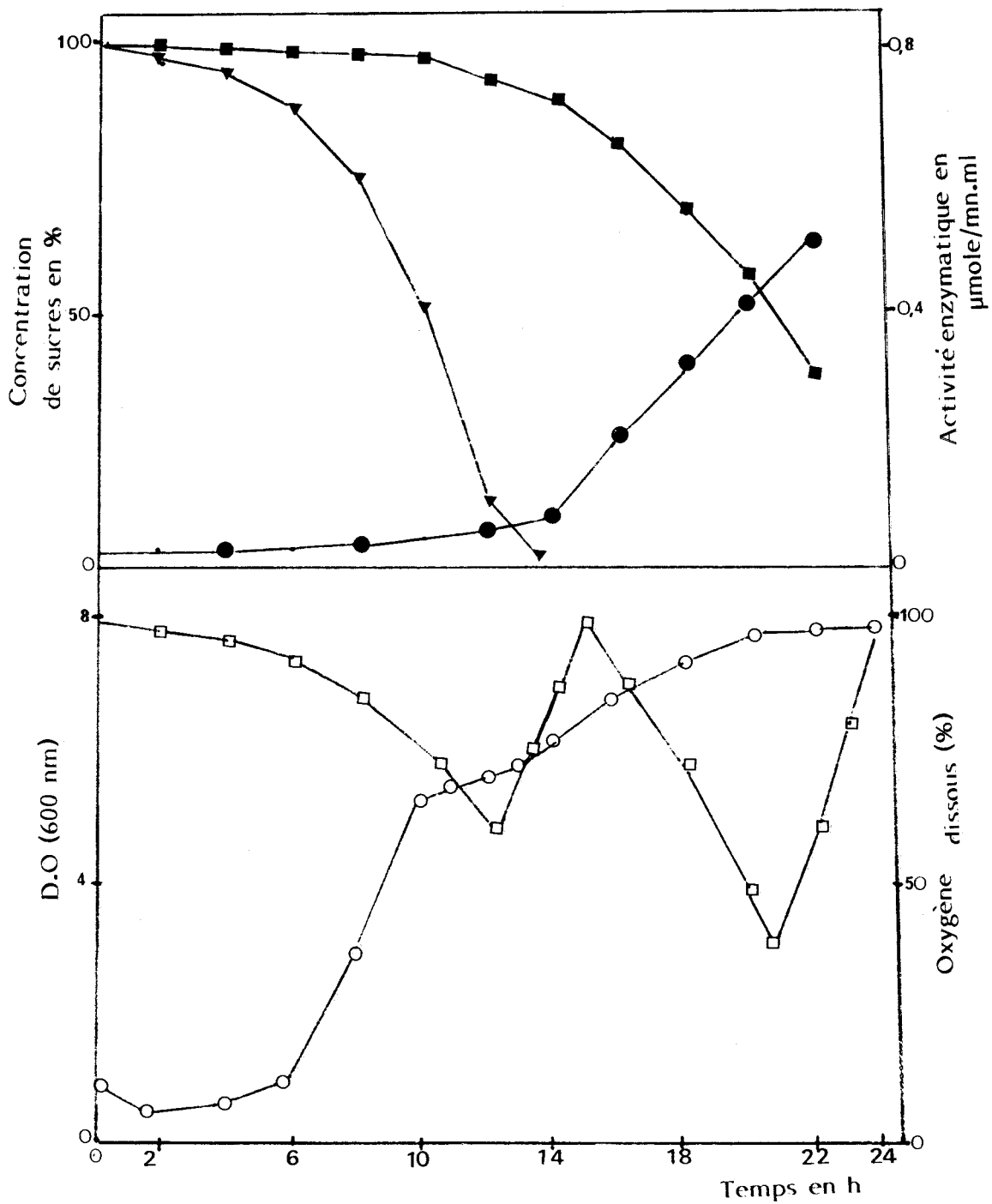


FIGURE 49 : Suivi de la croissance en D.O. (  $\circ$  ) à 600 nm, de l'évolution de l'oxygène dissous (  $\square$  ), de l'hydrolyse de l'inuline (  $\blacksquare$  ), de la consommation de glucose (  $\blacktriangledown$  ) et de la biosynthèse de l'enzyme (  $\bullet$  ) lors de la croissance de la souche en fermenteur en présence d'inuline (0,5 %) et de glucose (0,1 %).

complète que la synthèse et la libération de l'enzyme sont de nouveau observées.

Cette répression par le glucose semble être un phénomène essentiel de la régulation de la  $\beta$  fructofuranosidase extracellulaire de la souche isolée | comme d'ailleurs pour la plupart des enzymes extracellulaires (HARDER, 1979).

## 2. ISOLEMENT D'UN MUTANT RESISTANT A L'EFFET GLUCOSE

### 2.1 - Mutagenèse

Les radiations U.V. peuvent être utilisées pour les sélections de mutants ; nous considérons que cette méthode simple ne peut pas être efficace dans notre cas, car elle provoque des mutations réversibles qui peuvent être photoréactives.

Nous avons préféré utiliser les agents mutagènes chimiques. Nous avons choisi la nitrosoguanidine 5N-methyl N'N nitro-nitrosoguanidine) qui peut induire des insertions ou des délétions dans le génôme.

### 2.2 - Courbe de survie

A une culture en Erlen-Meyer de la souche en phase exponentielle de croissance, nous avons ajouté une solution de N.T.G. en tampon tris - malique 0,5 M à la concentration finale de 0,1 ou 0,5 g.l<sup>-1</sup>. La culture est mise à incuber et des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps réguliers, ces échantillons sont centrifugés le plus rapidement possible pour stopper le contact entre le N.T.G. et les cellules. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec un tampon phosphate 0,1 M, puis remis en suspension dans le même volume de sérum physiologique. On procède ensuite aux dilutions nécessaires (10 à 10<sup>-4</sup>) et à un comptage des colonies sur milieu synthétique solide.

Après cinq jours d'incubation, on peut compter les colonies apparues et calculer le rapport du nombre de cellules viables à un temps  $t$  de contact et au temps  $t = 0$ . On obtient ainsi le pourcentage de survie en fonction du temps de contact pour les deux concentrations d'agent mutagène (FIGURE 50 ). Une concentration en N.T.G. de 0,1 g/l permet encore, après une heure de contact, 40 % de survie. Les conditions retenues pour la mutagenèse étant 10 % de survie, la solution de N.T.G. à 0,5 g.l<sup>-1</sup> sera utilisée pendant 10 mn.

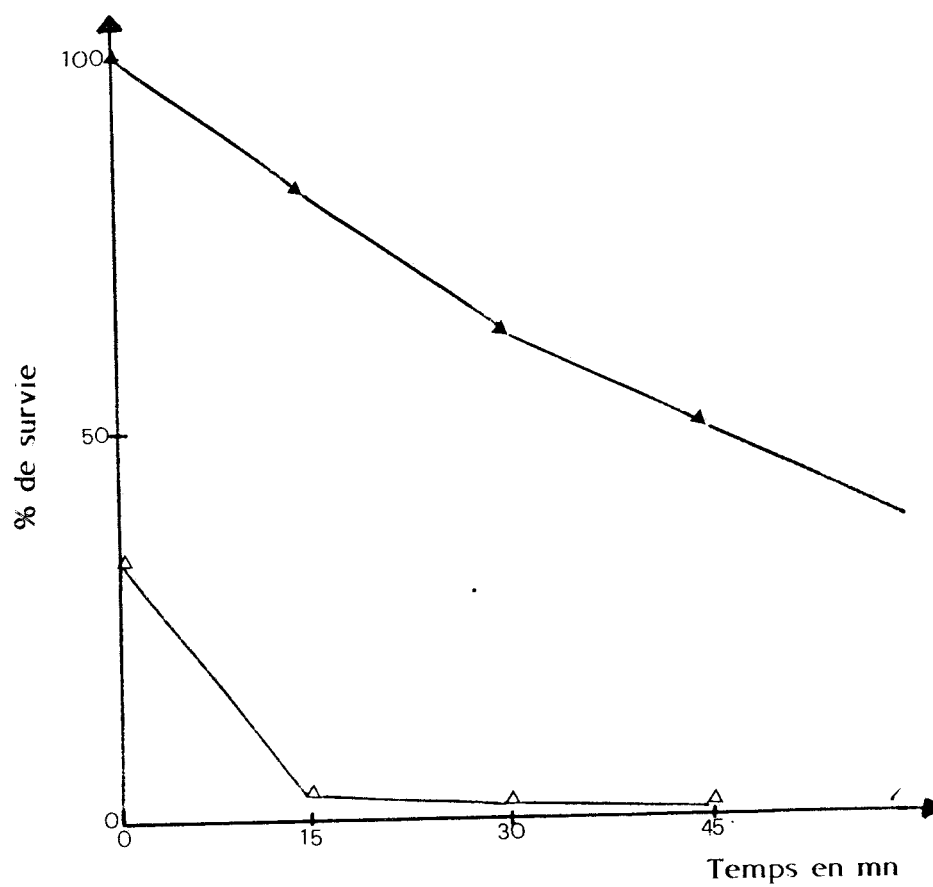


FIGURE 50 : Pourcentage de survie en fonction du temps de contact avec des solutions de N.T.G. à différentes concentrations :

( ▲ ) 0,1 mg/ml

( △ ) 0,5 mg/ml



### **2.3 - Enrichissement**

Nous avons utilisé la technique d'inoculation cyclique avec ou sans inducteur, inspirée de la méthode de **COHEN (1953)**, utilisée pour la sélection de mutants d'*E. coli* pouvant synthétiser de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -galactosidase.

Au départ, en présence du répresseur (le glucose), les mutants constitutifs ont le même taux de croissance que les autres cellules, mais quand on remplace le répresseur par l'inducteur (l'inuline), les mutants constitutifs sont favorisés par rapport aux mutants inductibles ; ils n'ont pas de phase de latence. Après un certain nombre de cycles, la population bactérienne contient une très forte proportion des mutants constitutifs. Nous avons appliqué cette méthode à notre souche. Après 24 heures de culture sur milieu synthétique contenant le glucose à une concentration de 0,5 %, les cellules sont transférées sur milieu contenant 0,5 % d'inuline ; nous avons dû faire cinq séries pour obtenir un résultat satisfaisant.

### **2.4 - Sélection du mutant**

Nous avons utilisé la méthode simple et fiable de **LEPESANT (1968)**. Après mutagénèse à la N.T.G. et enrichissement, les bactéries sont étalées sur milieu synthétique contenant 0,1 % de glycérol. Après 48 heures de culture à 30° C, on pulvérise à la surface des boîtes une solution stérile de saccharose à 50 % ; on incube à nouveau pendant 2 heures à 30° C. On pulvérise ensuite les réactifs du "glucostat". Une auréole rouge correspondant à une formation plus abondante de glucose apparaît alors à la température ambiante. Les colonies mutantes produisent beaucoup plus de  $\beta$  fructofuranosidase que celles de la souche sauvage.

Parmi les cinq colonies détectées par cette méthode, nous en avons retenue une qui a montré une réaction fortement positive.

### **2.5 - Caractéristique du mutant retenu**

Les différentes caractéristiques de ce mutant ont été étudiées par comparaison avec la souche sauvage. La durée de la stabilité de la mutation a été vérifiée au cours de la croissance après une centaine de générations.

### **2.6 - Croissance et production de l'enzyme par le mutant**

#### **2.6.1 - Etude en Erlen-Meyer sur différentes sources de carbone**

Nous avons suivi, comme pour la souche sauvage, la croissance bactérienne et l'apparition de l'activité enzymatique dans les milieux de

cultures synthétiques contenant les différentes sources de carbones : glucose 0,5 %, saccharose 0,5 %, inuline 0,5 % et inuline (0,85 %) + glucose (0,25 %). Cette étude a été réalisée en Erlen Meyer à 30° C, sous agitation et pH 7.

Les résultats obtenus sont résumés dans la FIGURE 51 . Avec le glucose comme seule source de carbone, l'activité enzymatique de la souche sauvage est pratiquement nulle, la synthèse de l'enzyme est fortement réprimée. Par contre, chez le mutant, nous constatons que l'activité enzymatique est importante vers la fin de la phase exponentielle et durant la phase stationnaire, elle est estimée à 0,4  $\mu\text{mole/mn/ml}$ , après 30 heures de croissance [FIGURE 51 (a)]. Il en est de même quand le substrat est le saccharose, avec une activité de l'ordre de 0,5  $\mu\text{mole/mn/ml}$  [FIGURE 51 (b)].

Dans le milieu ne contenant que de l'inuline comme seule source de carbone, l'induction de l'activité est de 1,2  $\mu\text{mole/mn/ml}$  [FIGURE 51 (c)] et trois à quatre fois plus importante que la souche sauvage (0,35  $\mu\text{mole/mn/ml}$ ).

Le rapport  $\frac{I}{S}$  est le même que celui de la souche sauvage, environ 0,22.

En présence d'inuline et de glucose [FIGURE 51 (d)], la souche mutante ne montre aucun phénomène de diauxie, et la biosynthèse s'effectue régulièrement au cours de la croissance bactérienne, avec une accumulation maximale pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire.

### 2.6.2 - Etude en fermenteur

Nous avons réalisé des cultures de la souche mutante en fermenteur ( $K_{La}$  de  $15 \text{ h}^{-1}$ ) en présence de glucose et d'inuline, l'évolution de l'oxygène dissous (FIGURE 52 ) montre que :

- durant la phase de latence, le milieu reste saturé en oxygène dissous ;
- durant la phase exponentielle de croissance, le taux d'oxygène diminue ;
- au début de la phase stationnaire, le milieu se resature en oxygène.

Parallèlement, nous constatons au cours de la croissance bactérienne, une hydrolyse progressive de l'inuline avec libération de l'enzyme au fur et à mesure de la division cellulaire ; l'effet inhibiteur de glucose est totalement absent dans ces conditions.



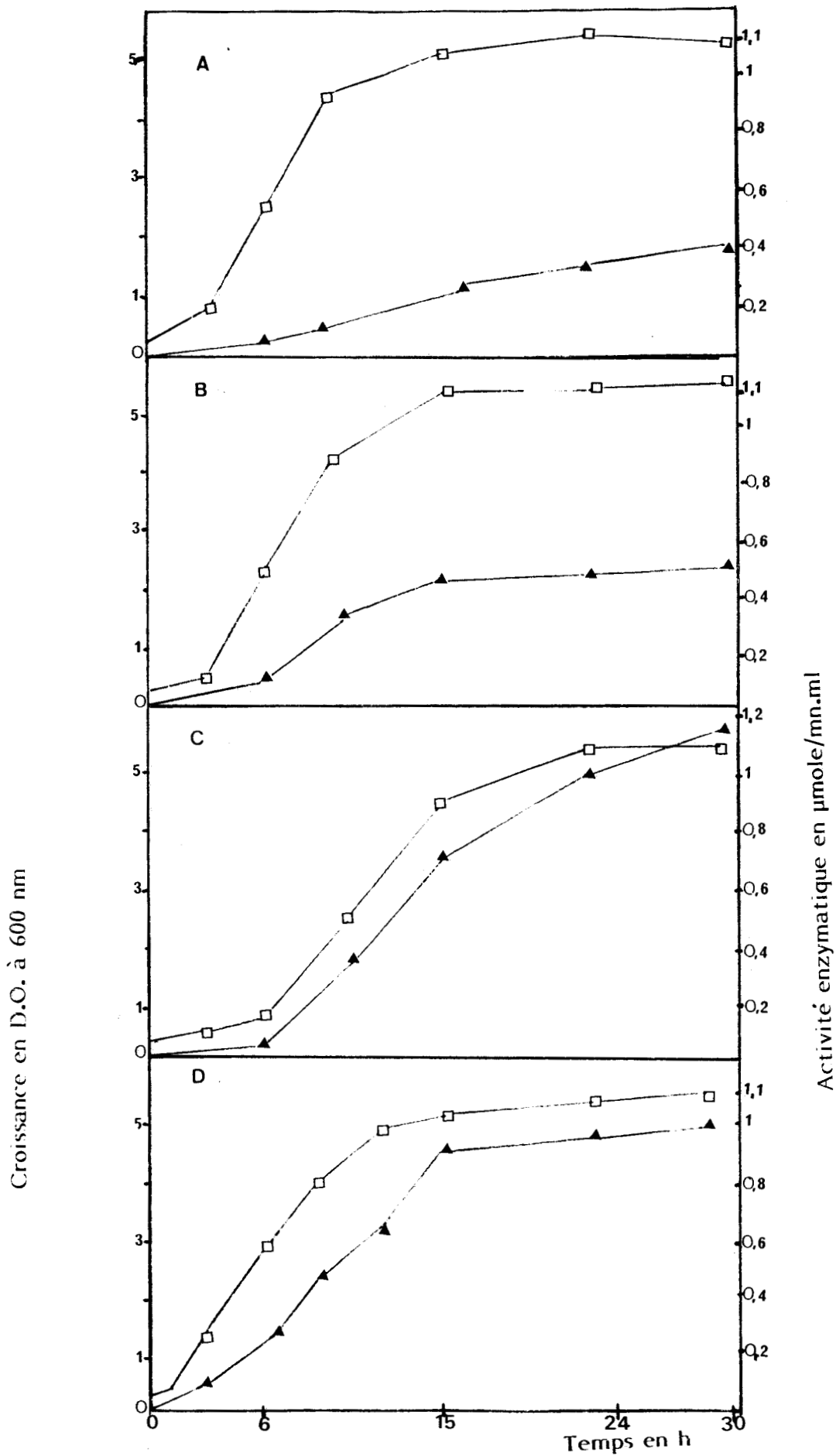


FIGURE 51 : Evolution de l'activité enzymatique ( ▲ ) au cours de la croissance bactérienne ( □ ) en milieu synthétique contenant différentes sources de carbone.

A) glucose (0,5 %) ; B) saccharose (0,5 %) ; C) inuline (0,5 %) ; D) inuline (0,25 %) + glucose (0,25 %).



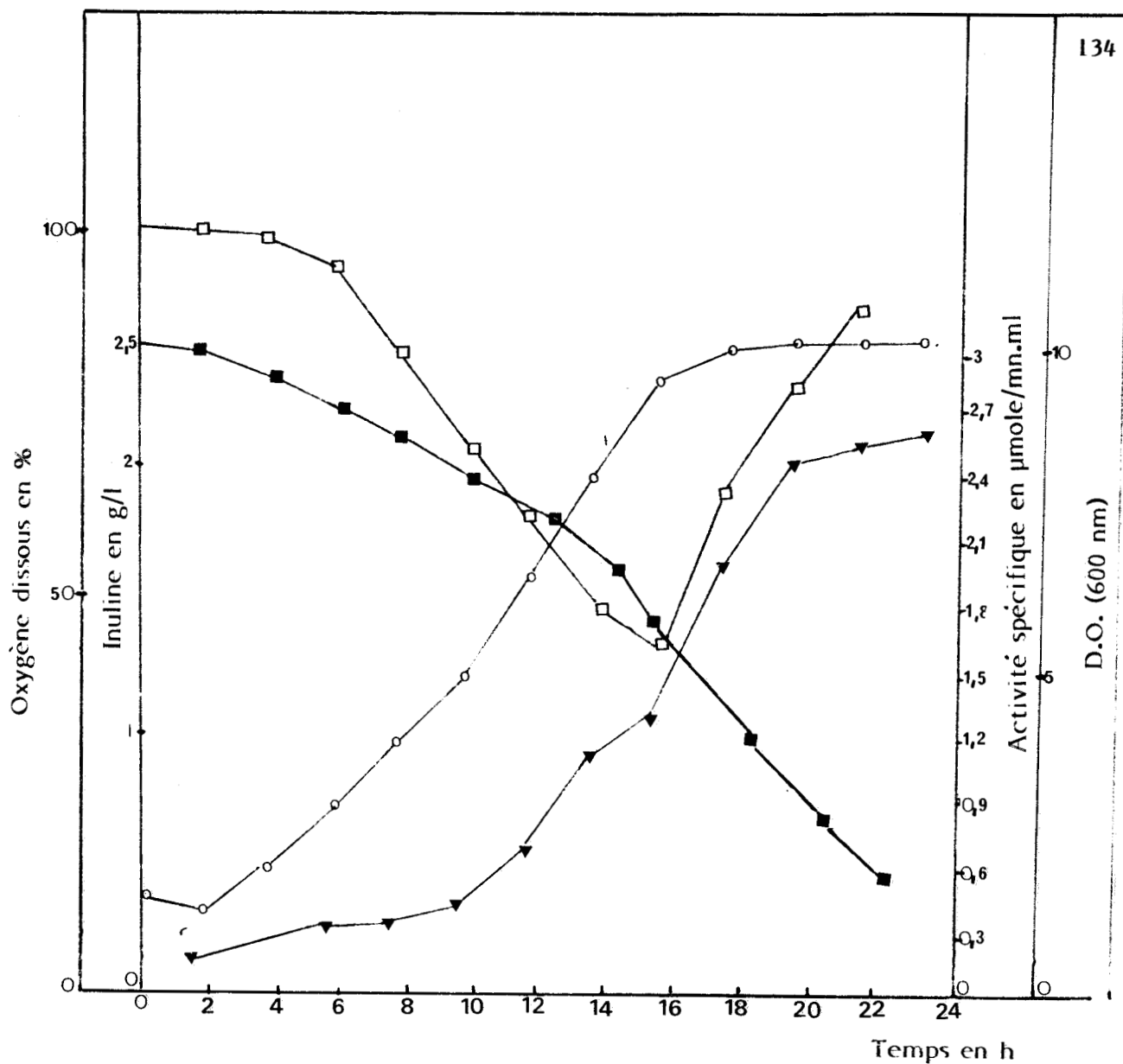


FIGURE 52 : Suivi de la densité optique à 600 nm ( ○ ), de la variation de l'oxygène dissous ( □ ), de l'hydrolyse de l'inuline ( ■ ) et de l'apparition de l'activité enzymatique ( ▼ ) lors de la croissance de la souche mutante en présence de 0,25 % de glucose et 0,25 % d'inuline, étude effectuée en réacteur.

## 2.7 - Influence de la mutation sur la nature du système enzymatique

Nous avons vérifié toutes les caractéristiques et les paramètres physico-chimiques de l'enzyme étudiée ; nous n'avons pas pu constater de différence particulière avec l'enzyme de la souche sauvage. La FIGURE 53 montre une séparation chromatographique sur ultrogel ACA 34.

Nous constatons que l'activité enzymatique vis-à-vis de l'inuline et du saccharose dépend d'une seule fraction active, constituée d'une seule protéine enzymatique.

Comme pour *Saccharomyces cerevisiae* (ABRAMS et COLL; 1978) productrice d'invertase, la mutation ne semble pas affecter la nature du système enzymatique.

## 2.8 - Discussion

Avec la souche mutante isolée, nous avons obtenu une importante amélioration de la production de l'activité enzymatique. Cette activité demeure importante en présence du substrat répressif (glucose). Malgré la présence d'inuline dans le milieu de culture, le phénomène de diauxie est levé et l'effet inhibiteur du glucose est fortement diminué.

La mutation n'a pas affecté les propriétés et les caractéristiques physico-chimiques de la préparation enzymatique.

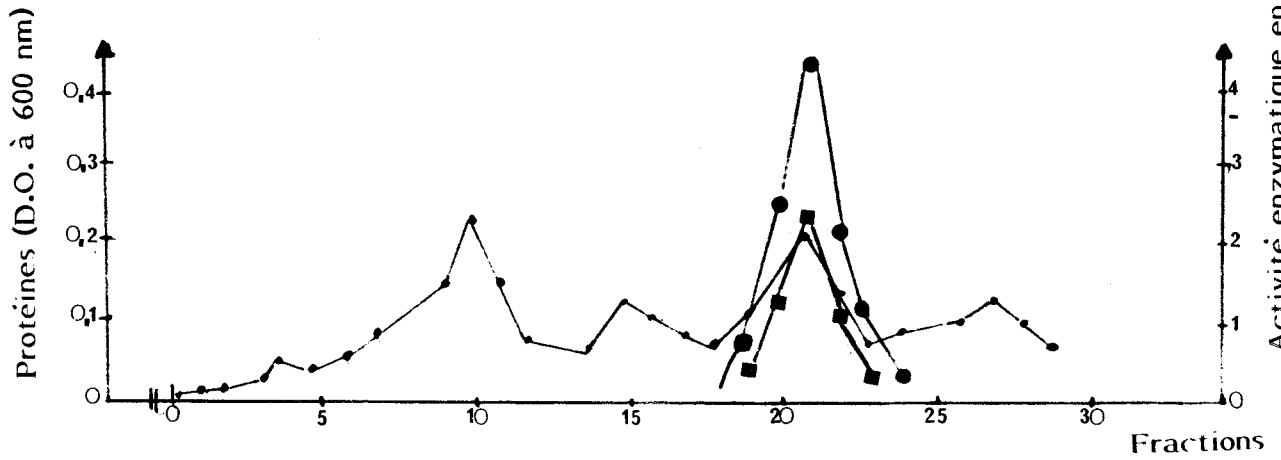


FIGURE 53 : Séparation par chromatographie sur gel de filtration "Ultrogel ACA 34" de la solution enzymatique obtenue avec la souche mutante (fraction 60 - 80 % de saturation en sulfate d'ammonium).

(—●—) densité optique à 280 nm

(●) substrat le saccharose

(■) substrat l'inuline



## CHAPITRE VIII

Essai de production du fructose par  
hydrolyse enzymatique

— o O o —

L'utilisation des enzymes pour la production du fructose a été envisagée dès 1943 par HEMMI et TOMITA, puis INAGAKI et HONJO (1949), par KIM (1975) à partir d'inulinase fongique. BRAWN et NAHM (1978) ont montré que l'inulinase de *K. fragilis* pouvait être utilisée pour hydrolyser les polyfructosanes du topinambour, et FLEMING et GROOTWASSIN (1979) ont montré que ce procédé était plus avantageux que l'hydrolyse chimique.

KIERSTAN (1980) préconise ce type d'hydrolyse pour la fabrication de sirops à haute teneur en fructose. Récemment, GUIRAUD (1981) a étudié la possibilité d'utilisation des inulinases de diverses levures pour la production de fructose à partir d'extrait de topinambour. Nous allons montrer dans ce chapitre que l'enzyme de la souche sélectionnée peut être utilisée dans ce but.

L'enzyme a été recueillie après culture sur milieu contenant 0,5 % d'inuline dans un réacteur de 3 l. Après élimination des cellules par centrifugation suivie d'une filtration stérilisante, le milieu a été dialysé, puis concentré par précipitation au sulfate d'ammonium (70 % de saturation). L'enzyme n'a pas été purifiée davantage.

## 1. ETUDE DE LA CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DE L'INULINE PURE

Nous avons utilisé une préparation enzymatique obtenue selon la méthode décrite précédemment. Le milieu réactionnel contient 50 mg/ml d'inuline pure du commerce (Merck) et contenant 20 U.I. pour 100 ml.

La réaction est réalisée en Erlen-Meyer et au bain-marie agité, à température et pH optimal de l'enzyme (50° C, pH 6). Des prélèvements sont effectués régulièrement toutes les deux heures pendant 24 heures. La cinétique d'hydrolyse a été suivie par H.P.L.C. et par dosages des sucres réducteurs. La FIGURE 54 rassemble les résultats obtenus.

Dans nos conditions expérimentales, nous observons d'abord une chute brutale de l'inuline au cours des deux premières heures (environ 60 %) ; pendant ce même temps les sucres réducteurs augmentent régulièrement de façon importante. Après cette période, l'hydrolyse de l'inuline est relativement lente, alors que les sucres continuent à augmenter. La cinétique d'apparition du fructose se superpose à celle des sucres réducteurs ; le glucose apparaît tardivement.

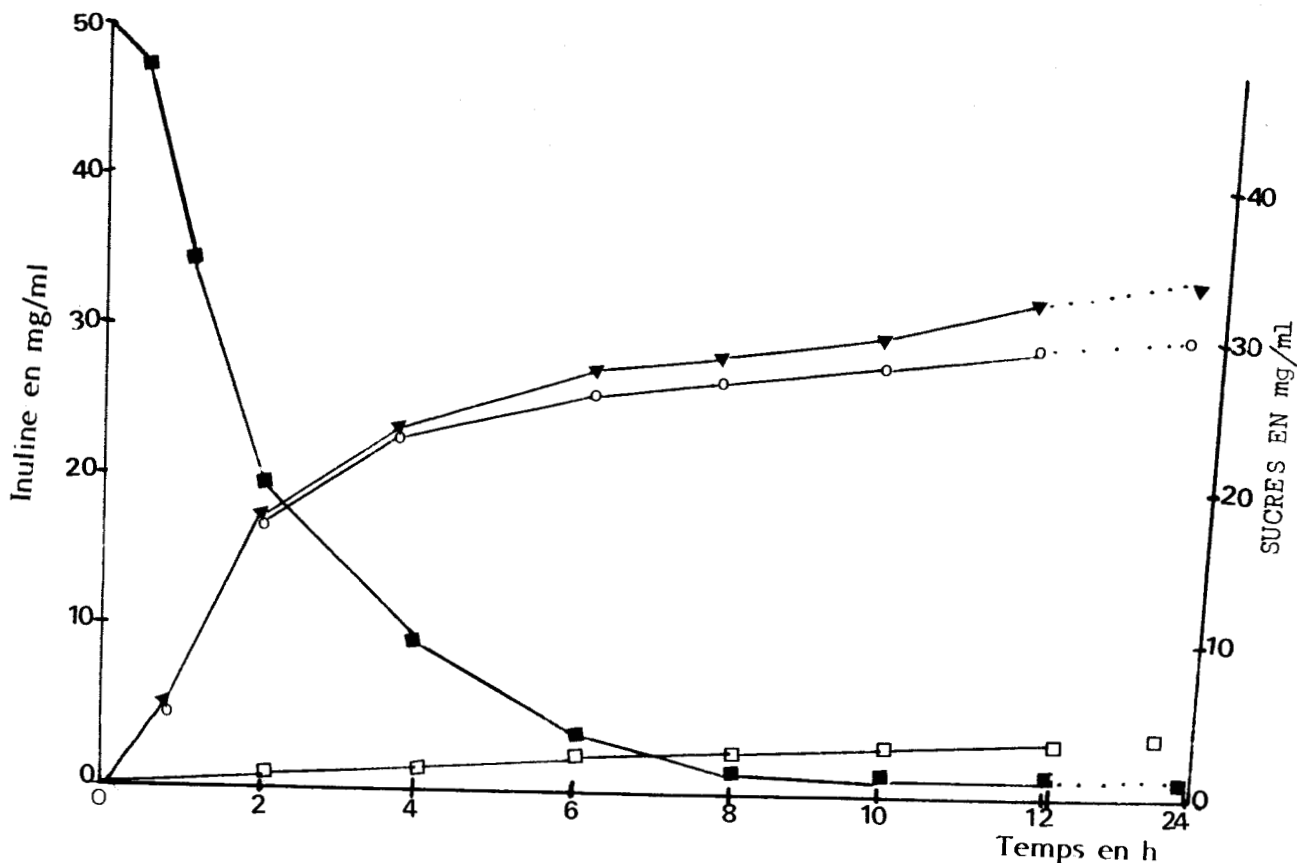


FIGURE 54 : Cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'inuline pure.

( ■ ) inuline ; ( ▼ ) sucres réducteurs ; ( O ) fructose ; ( □ ) glucose

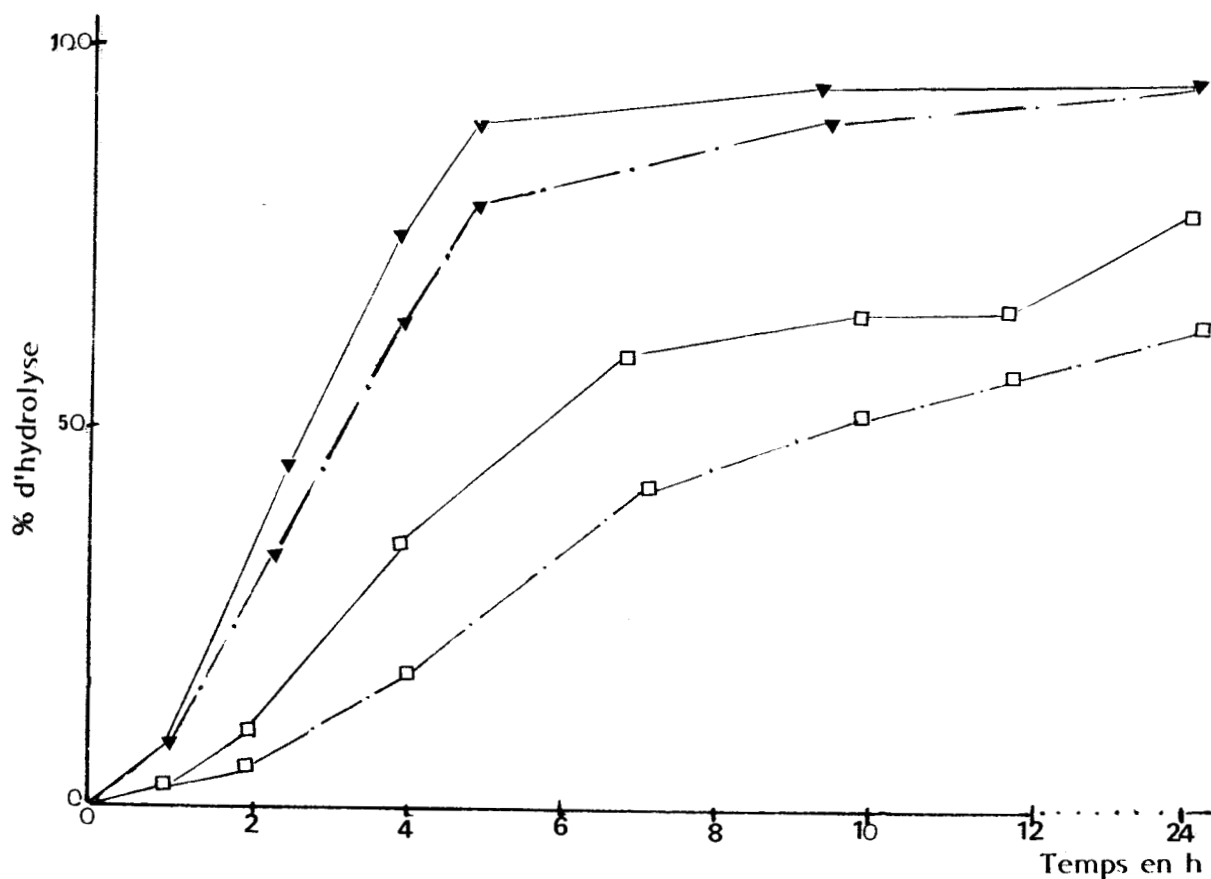


FIGURE 55 : Hydrolyse enzymatique de solutions de l'inuline pure à 20 g/l ( ▼ ) et 200 g/l ( □ ) par des préparations enzymatiques à 0,4 U.I./ml ( — ) et à 0,2 U.I. ( - - - ) d'inulinase.



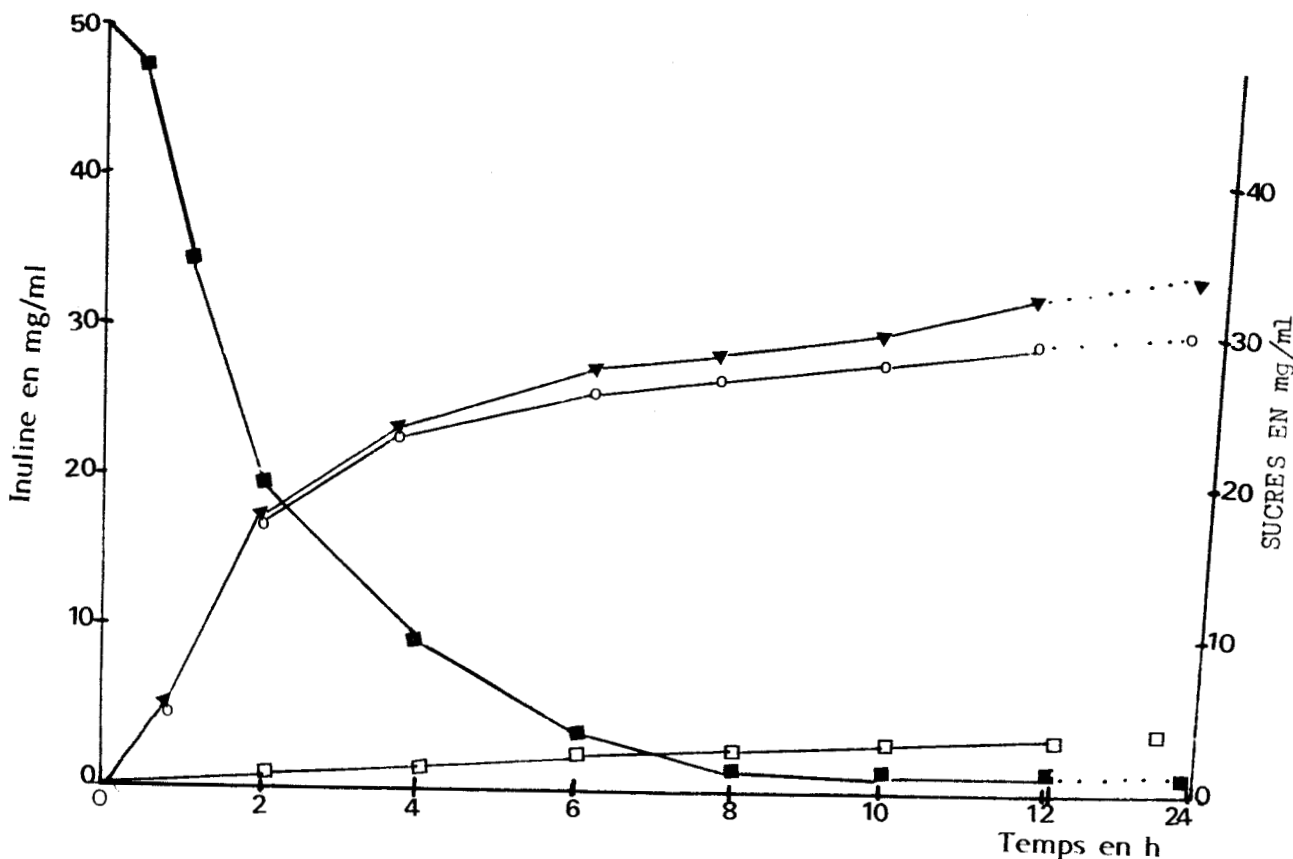


FIGURE 54 : Cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'inuline pure.  
 ( ■ ) inuline ; ( ▼ ) sucres réducteurs ; ( ○ ) fructose ; ( □ ) glucose

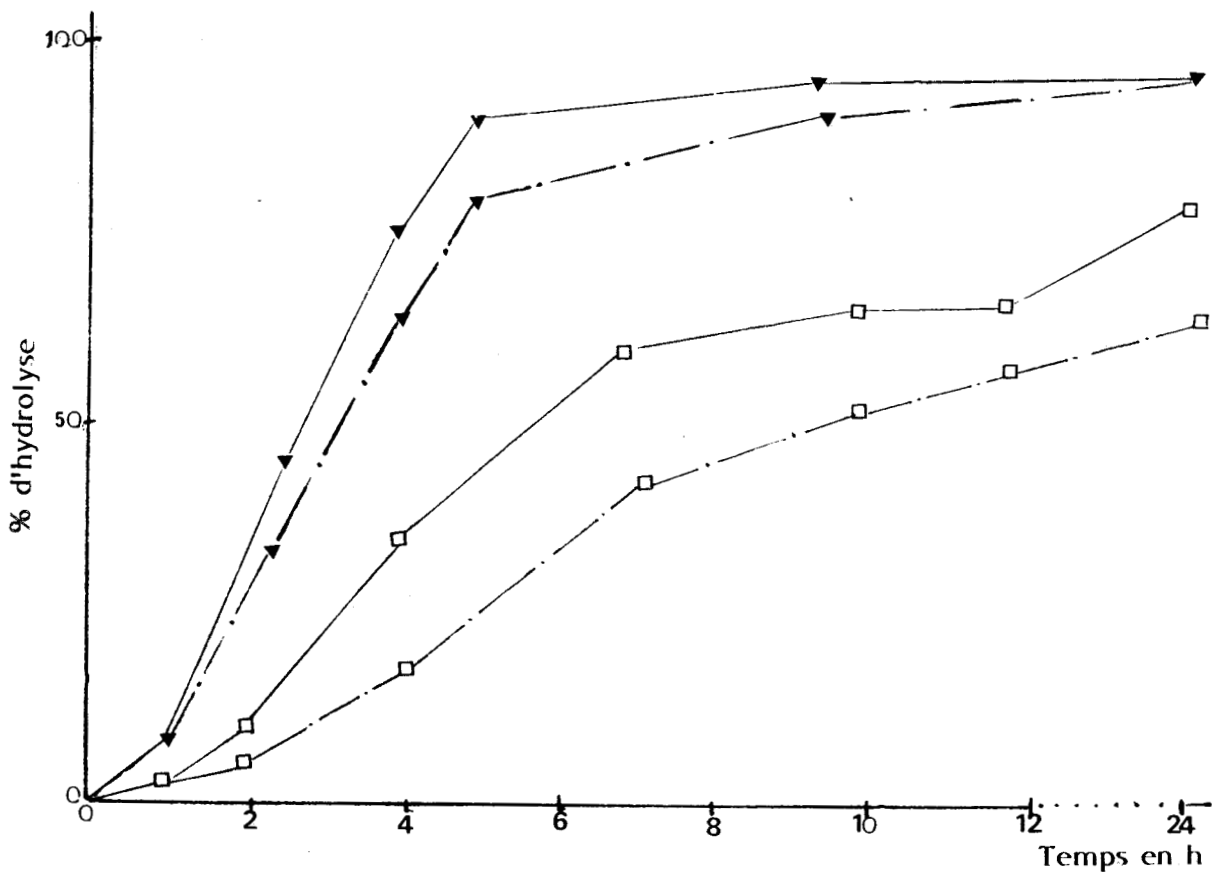


FIGURE 55 : Hydrolyse enzymatique de solutions de l'inuline pure à 20 g/l ( ▼ ) et 200 g/l ( □ ) par des préparations enzymatiques à 0,4 U.I./ml ( — ) et à 0,2 U.I. ( - - - ) d'inulinase.



Par ailleurs, nous avons étudié l'hydrolyse des solutions d'inuline à 20 g/l et 200 g/l ; nous avons utilisé des solutions enzymatiques permettant d'obtenir une concentration de 0,2 U.I./ml (soit 200 U.I./l) et 0,4 U.I./ml (soit 400 U.I./l). L'expérience a été réalisée comme précédemment.

Comme on pouvait s'y attendre (FIGURE 55), la baisse de la concentration en inuline et l'augmentation de la concentration en enzyme sont favorables à l'hydrolyse.

Une hydrolyse totale a été obtenue avec la solution d'inuline à 20 g/l et avec la solution enzymatique à 0,4 unité/ml en 6 heures. Pour la solution contenant 200 g/l d'inuline, 80 % d'hydrolyse ne sont obtenus qu'après 24 heures d'incubation avec la solution enzymatique à 0,4 U.I./ml.

## 2. CINETIQUE D'HYDROLYSE D'UN EXTRAIT DE RACINE D'ENDIVE

Nous avons ensuite étudié, dans les mêmes conditions, l'hydrolyse d'un extrait de chicorée obtenu par diffusion à 80° C et contenant 80 g/l de sucres totaux.

L'hydrolyse s'effectue à l'aide d'un extrait enzymatique à 0,4 U.I./ml. La FIGURE 56 et le TABLEAU 19 rassemblent les résultats obtenus. Là aussi, l'hydrolyse est intense pendant les six premières heures d'incubation, avec une apparition progressive des sucres réducteurs.

Les résultats sont meilleurs que ceux obtenus avec l'inuline pure, ceci est normal dans la mesure où l'activité de la  $\beta$  fructofuranosidase isolée est meilleure sur le saccharose que sur l'inuline. L'extrait d'endive contient une quantité importante de saccharose et de polymères de faibles poids moléculaires, ce qui explique le taux important de glucose apparu au cours de l'hydrolyse. **BYUN et NAHM (1978)** ont trouvé des résultats semblables avec l'enzyme de *K. fragilis*.

## 3. COMPARAISON ENTRE L'HYDROLYSE CHIMIQUE ET L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Il nous a paru intéressant de comparer l'hydrolyse chimique et l'hydrolyse enzymatique.

Le TABLEAU 19 et la FIGURE 57 présentent les cinétiques de ces deux types d'hydrolyses effectués dans les conditions décrites en Matériel

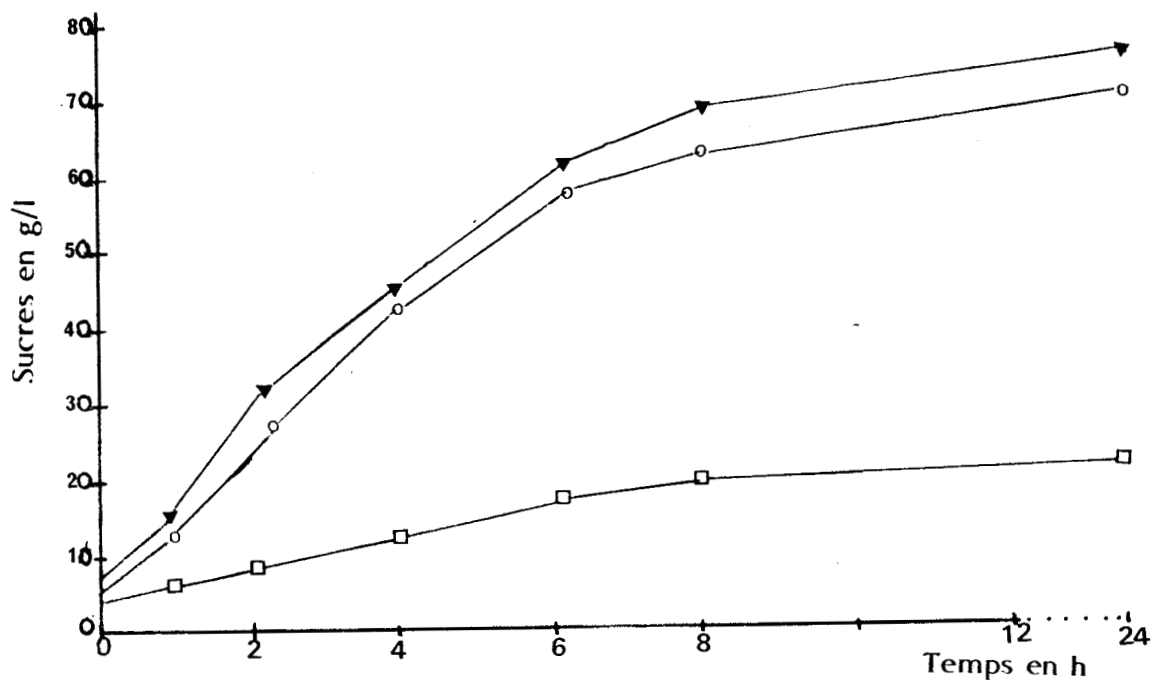


FIGURE 56 : Hydrolyse d'un extrait de racines d'endive contenant 80 g/l de sucres totaux.

(▼) sucres réducteurs ; (○) fructose ; (□) glucose

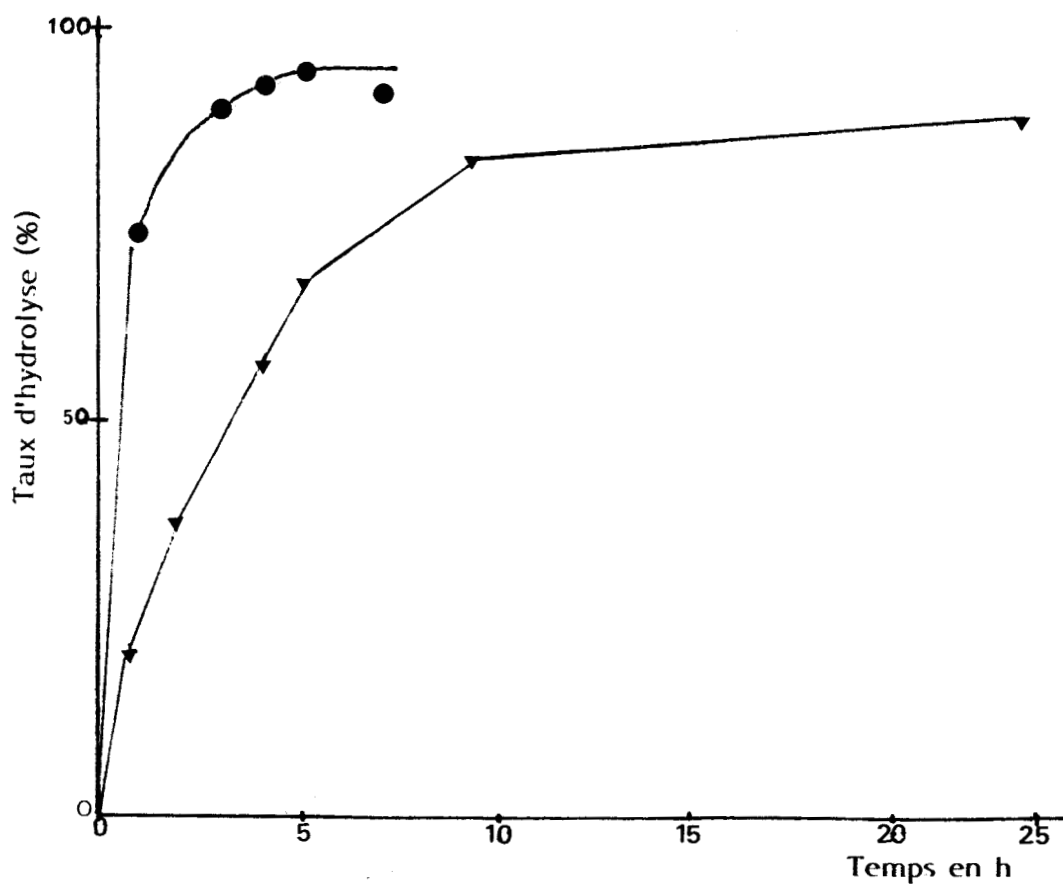


FIGURE 57 : Hydrolyse acide (●) et enzymatique (▼) d'un extrait de racines d'endives contenant 80 g/l de sucres totaux.



Temps en heure		0	1	2	3	4	5	6	7	25
<b>Hydrolyse acide</b>	Sucres réducteurs en g/l	5	59	70,75	71,15	73	75	72	72	-
	Fructose en g/l	0,6	51	-	61,8	-	-	62,6	-	-
	Glucose en g/l	0,2	10,8	-	18,3	-	-	18,7	-	-
	Taux d'hydrolyse en %		73	88	88	90	92	90	90	
<b>Hydrolyse enzymatique</b>	Sucres réducteurs en g/l	5	15,25	29,30	37,29	45	53,7	60,7	66	76,25
	Fructose en g/l	0,6			36,6	-	-	-	63,2	70,15
	Glucose en g/l	0,2			10	-	-	-	18	18,22
	Taux d'hydrolyse en %	-	19	37	47	56	67	73	82	95

TABLEAU 19 : Hydrolyse acide et enzymatique d'un extrait de racines d'endive contenant 80 g/l de sucres totaux.



et Méthodes. Le pourcentage d'hydrolyse est défini par le rapport des sucres réducteurs sur les sucres totaux.

L'hydrolyse acide est rapide, complète après 3 heures ; mais l'hydrolyse acide est responsable d'une dégradation partielle du fructose avec formation d'environ 5 % de dianhydride de fructose (ZITTAN, 1981).

Une chromatographie sur couche mince met en évidence la présence de saccharose dont la liaison est difficilement hydrolysable et de ses dérivés pendant toute la durée de la réaction. Après 3 heures d'hydrolyse acide, on note la formation d'un composé dont la migration est beaucoup plus rapide que celle des oses, qui ne disparaît pas pour des temps plus longs de réaction et qui pourrait être de nature furfuralique.

L'hydrolyse enzymatique pour la production du fructose est possible mais ne donne pas de meilleurs résultats que l'hydrolyse acide à pH 2 et à 100° C. Il faut cependant noter une différence essentielle entre les deux types d'hydrolyse : l'hydrolyse chimique affecte d'abord les hauts polymères et, en dernier ressort, le saccharose ; c'est l'inverse qui se produit pour l'hydrolyse enzymatique.

Pour un même pourcentage d'hydrolyse, la teneur en monomères est plus élevée par hydrolyse enzymatique. L'hydrolyse enzymatique n'entraîne pas la formation de colorations, ni de produits secondaires, et affecte donc beaucoup moins l'aspect et les qualités du produit final.

L'enzyme a permis, dans nos conditions expérimentales, d'obtenir une hydrolyse complète après 24 à 28 heures.

## CONCLUSION GENERALE

Les plantes dont les réserves sont constituées de polyfructosanes de type inuline constituent une importante source potentielle de substrats carbonés utilisables industriellement. La chicorée, culture de la région Nord - Pas-de-Calais, est de ce type.

Dans le cadre de la valorisation des racines d'endive après qu'elles aient donné par forçage la "salade d'endives", nous avons orienté notre travail vers une meilleure connaissance de l'évolution de la masse principale des réserves glucidiques lors de leur stockage. Comme pour un grand nombre d'espèces de la famille des Composées, l'inuline est le principal hydrate de carbone. C'est un glucofructosane dont la molécule, constituée de 35 à 40 molécules de fructose reliées par des liaisons glucosidiques  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), se termine par un diholoside non réducteur, le saccharose. Ces fructosanes sont localisés dans les vacuoles des cellules végétales représentant des réserves facilement disponibles. Leurs variations qualitatives et quantitatives au cours de la croissance, avant et après forçage de la racine, ont pu être suivies grâce à la mise au point préalable, au laboratoire, de techniques fines d'analyses des glucides (H.P.L.C., chromatographie de perméation, etc...). La constitution, en glucides de la racine, est variable en fonction de l'âge de la racine, beaucoup d'inuline hautement polymérisée est obtenue dans des tubercules jeunes et frais alors qu'une disparition progressive survient au cours de la maturation et du stockage. Il est donc évident que l'on pourra obtenir des solutions d'autant plus riches en polyfructosanes que le produit sera jeune et frais ; ceci est fondamental pour la production de sirop de fructose de haute qualité. Par contre, la richesse relative des excédents des produits récoltés tardivement ou mal conservés, sera plus faible. La valorisation de ces polyfructosanes passe obligatoirement par l'hydrolyse.

L'hydrolyse chimique, que nous avons également étudiée, peut présenter des inconvénients en fonction des buts recherchés. Certains auteurs ont utilisé des inulinases fongiques et des levures. Ces inulinases sont généralement endocellulaires, leur emploi dans l'industrie est limité par leur isolement qui nécessite des traitements préalables des cellules qui les contiennent. Une partie essentielle de notre travail a donc consisté à rechercher des bactéries à  $\beta$  fructofuranosidases exocellulaires, convenant parfaitement à la réalisation d'une opération industrielle, et à étudier les propriétés régissant son fonctionnement.

Parmi les bactéries se développant sur inuline comme unique source de carbone, nous avons montré que la souche sélectionnée excrète dans le milieu de culture des quantités importantes de  $\beta$  fructofuranosidase, active sur inuline et également sur d'autres  $\beta$  fructosides (raffinose et saccharose) avec un rapport inuline/saccharose ( $\frac{I}{S}$ ) d'environ 0,22. La biosynthèse de la  $\beta$  fructofuranosidase est fortement induite par l'inuline et, à moindre degré, par les autres  $\beta$  fructosides ; aucune activité n'est décelable après culture sur hexoses. Elle s'effectue régulièrement au cours de la croissance bactérienne ; l'optimum d'activité est obtenu en fin de phase exponentielle. Elle est favorisée par l'action du nitrate de sodium comme source d'azote, le sulfate de magnésium, le fer et le calcium. La synthèse de l'enzyme est inhibée par le glucose, l'utilisation de la N.T.G. a permis d'obtenir un mutant résistant à cet effet glucose. Cette souche produit trois à cinq fois plus d'enzymes que la souche sauvage.

La  $\beta$  fructofuranosidase a été purifiée à partir du milieu de culture par différentes précipitations au sulfate d'ammonium et passages sur colonnes (D.E.A.E. cellulose, Ultrogel, ACA 34, chromatographie d'affinité, électrophorèse). On a obtenu une solution enzymatique ne contenant qu'une seule protéine. Si l'on examine les propriétés de l'enzyme isolée, nous pouvons faire les observations suivantes : l'enzyme fonctionne jusqu'à des pH supérieurs à 4,5 ; elle est dénaturée à des pH inférieurs à 4 ; le pH optimum est de l'ordre de 6 sur les trois substrats : inuline, raffinose et saccharose. La température optimale d'activité varie entre 45° C et 50° C ; l'enzyme reste stable au moins 30 mn à la température optimale 50° C ; mais au-delà, elle se dénature d'autant plus rapidement que la température s'élève jusqu'à 70° C. La baisse d'activité par dénaturation thermique est toujours plus importante avec l'inuline qu'avec le raffinose et surtout le saccharose, comme le montrent les valeurs d'énergies d'activations obtenues pour chacun des substrats.

L'étude de l'influence de divers inhibiteurs a montré que, malgré des petites différences, le comportement est identique lorsque l'on utilise différents substrats (inuline, raffinose et saccharose). Les inhibiteurs de l'activité enzymatique sont essentiellement  $Ag^+$ ,  $Hg^{++}$ . L'inhibition par le N.E.M., l'iodoacétate et le parahydroxymercurobenzoate, indique la présence de groupements thiols dans le site actif de l'enzyme. L'enzyme possède une action de type  $\beta$  fructofuranosidasique, action de type "exo" selon le mécanisme "single chain" attaquant préférentiellement le côté composé de fructose de la molécule de l'inuline. Les constantes d'affinités de l'enzyme purifiée sont  $0,25 \cdot 10^{-2}$  M pour l'inuline,  $1,25 \cdot 10^{-2}$  M pour le saccharose, et  $4 \cdot 10^{-2}$  pour le raffinose. La  $\beta$  fructofuranosidase

est une glycoprotéine possédant une masse moléculaire de l'ordre de 130 000 (constituée de deux sous-unités) et une activité moléculaire spécifique de 220 moles d'inuline transformées par minute et par mole d'enzyme.

La courbe de  $pK_m$  et de  $V_m$  en fonction du pH indique que les groupements qui interviennent dans l'affinité pour le saccharose et l'inuline sont vraisemblablement identiques. Le premier  $pK$  est situé aux environs de 4,5 et correspond certainement à un groupement carboxyl. Le deuxième  $pK$  est situé aux environs de 6,5, ce qui correspondrait à l'intervention d'un groupement imidazole ou  $\alpha$  aminé ou des deux.

Nous avons enfin étudié la possibilité d'utiliser la  $\beta$  fructofuranosidase de la souche isolée pour la production de fructose par l'hydrolyse enzymatique des extraits contenant les polyfructosanes.

A partir d'inuline pure, nous avons obtenu une hydrolyse totale avec la solution d'inuline pure à 20 g/l et une solution enzymatique de 0,4 U./ml en 6 heures. Pour une solution contenant 200 g/l d'inuline, 80 % d'hydrolyse ne sont obtenus qu'après 24 à 28 heures d'incubation avec la même solution enzymatique. A partir d'extraits de chicorée riches en inuline obtenue par diffusion à 80° C et contenant 80 g/l de sucres totaux, les résultats obtenus dans les mêmes conditions d'hydrolyse sont meilleurs que ceux obtenus avec l'inuline pure, ceci est normal dans la mesure où l'activité de la  $\beta$  fructofuranosidase isolée est meilleure sur le saccharose que sur l'inuline ; l'extrait d'endive contient une quantité importante de saccharose et de polymères de faibles poids moléculaires. Par ailleurs, nous avons réalisé une étude comparative entre l'hydrolyse enzymatique et acide. Les meilleurs résultats sont obtenus par hydrolyse acide à pH 2 et à 100° C si l'on se réfère à la vitesse et au taux final d'hydrolyse. Il faut noter cependant une différence de nature entre les deux types d'hydrolyse. Si l'hydrolyse chimique affecte d'abord les hauts poids moléculaires et, en dernier ressort, le saccharose, c'est l'inverse qui se produit pour l'hydrolyse enzymatique. A taux d'hydrolyse partielle égale, la teneur en monomère est plus élevée après hydrolyse enzymatique qu'après hydrolyse chimique. De plus, l'hydrolyse enzymatique présente un énorme avantage : elle n'entraîne pas la formation de coloration, ni de produits secondaires, et affecte donc beaucoup moins que l'hydrolyse chimique, l'aspect et la qualité du produit. L'hydrolyse enzymatique est donc préférable à l'hydrolyse chimique.

Au cours de cette étude, nous avons donc démontré qu'il était possible de valoriser la production de plantes à inuline après hydrolyse enzymatique de ce polymère. Il nous a paru intéressant de présenter les applications possibles. En principe, les jus obtenus par diffusion à partir des cossettes peuvent être valorisés de différentes façons :

- fabrication d'un sirop à haute teneur en fructose capable de concurrencer l'isomérose ;

- production d'aliments concentrés liquides ou déshydratés : les pellets qui permettraient l'utilisation du potentiel énergétique des carottes d'endive ;

- obtention de substrats carbonés directement fermentescibles pouvant fournir la source de carbone pour la production de levure, la production d'alcool et la production de biogaz.

Il existe donc une grande diversité d'applications possibles pour la valorisation des carottes d'endives par hydrolyse enzymatique. Ces applications énoncées devront faire l'objet d'études techniques et économiques.



## BIBLIOGRAPHIE

**ABRAMS H.J., 1975.**

Distillation and the reduction of product separation cost in fermentation processes.

Octagon papers II, large scale fermentation for organic solvents, Bullock J.D. et Powell A.J. ed., Univ. Dept. Ext. Stud., Manchester.

**ABRAMS B., HAKEL R. and LAMPEN J.D., 1978.**

Relationship of large and small invertase in *Saccharomyces* : mutant selectively deficient in small invertase.

Journal of Bacteriology, **135**, 809.

**AKAZAWA J., 1965.**

Reserves polysaccharides.

In : Plant Biochemistry, Acad. Press., BONNER J. et VARNER J.E. ed., p. 285.

**ARCHBOLD H.K., 1940.**

Fructosans in the monocotyledons.

A Review, New, Phytol. **39**, 185.

**ARNOLD W.N., 1974.**

Expression of cryptic  $\beta$  fructofuranosidase in *Saccharomyces rouxii*.

J. Bacteriol, **120**, 886.

**AVIGAD G. et BAUER S., 1966.**

Fructan hydrolase.

In : Methods in Enzymology. Colowick S.P. et Kaplan N.D. ed., Acad. Press, Vol. 8, p. 621.

**AVIGAD G. et FEINGOLD D.S., 1957**

Fructosides formed from sucrose by a *Corynebacterium*.

Arch. Biochem. Biophys., **70**, 178.

**AVIGAD G. et HESTREIN S., 1956.**

An enzymic synthesis of a sucrose analog :  $\alpha$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranoside.  
Biochim. et Biophys., Acta, 20, 129.

**AVIGAD G. et ZELIKSON R., 1963.**

Cleavage of fructans to levanbiose by a specific hydrolase.  
Bull. Res. Counc., 11, 253.

**AXELROD B., 1965.**

Highers polysaccharides.

In : Plant Biochemistry, Acad. Press. Bonner J. et Varner J.E. ed., p. 245.

**BACON J.S.D. et EDELMAN J., 1951.**

The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other compositae.  
Biochem. J., 48, 114.

**BACON J.S.D. et LOXLEY R., 1952.**

Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem artichoke tuber.  
Bioch. J., 51, 208.

**BAILLARGE E., 1942.**

Flammarion, ed. Paris.

**BAJON A.M. et GALZY P., 1984.**

Isolation of an inulinase depressed mutant of *Pichia polymorpha* for the production of fructose.

Biotechnol. and Bioeng., 26, 128.

**BARKER S.A., PAUTARD F., SIDDIQUI I.R. and STACEY M., 1955.**

The structure of polysaccharide synthesized by a *Streptococcus* isolated from a "ropy fermentation".

Chemistry and Industry, 1450-1451.

**BAUER S. et AVIGAD G., 1963.**

Properties of a bacterial levanhydrolase.

Proc. 23 Meeting Chem. Soc., 1, 211.

**BEIJERINCK M.W., 1912.**

Die durch bakterien and rohrzucker erzeugten schleimigen wand-stoffe.  
Folia Microbiol., 1, 1.

**BELL D.J. et DEDONDER R., 1954.**

A structural re-examination of the levans formed by *Pseudomonas prunicola* and *Bacillus subtilis*, BG2F1.  
J. Chem. Soc., 2866.

**BELL D.J. et PALMER A., 1952.**

Structural studies on inulin of *Inulina helenium* and on levans from *Dactylis glomerate* and *Lolium italicum*.  
J. Chem. Soc., 3763.

**BELUCHE I., GUIRAUD J.P. et GALZY P., 1980.**

Inulinase activity of *Debaromyces cantarellii*.  
Folia microbiologica, 25, 32.

**BERNFLED P., 1955.**

Methods in Enzymology.  
Vol. 1., Academic Press, inc., New-York.

**BERGMEYER H.U., BERUT E., SCHMIDT P. et STORK H., 1974.**

Dans : Methods of enzymatic analysis.  
Bergmeyer H.G. and Gawehnk A. ed., Acad. Press, New-York, Vol. 3, p. 1196.

**BHATIA I.S., MANN K.S. et SINGH R., 1974.**

Biochemical changes in the water-soluble carbohydrates during the development of chicory (*Cichorium intybus L.*) roots.  
J. Sci. Food Agric., 25, 535.

**BLANC M., 1978.**

La racine de chicorée torréfiée. Evolution de la composition en fructose au cours de traitements technologiques.  
Lebensm. Wiss Technol., 11, 19.

**BOINOT F., 1942.**

Le topinambour dans la fabrication de l'alcool.  
Bull. Assoc. Chim., 59, 792.

**BOSER H., 1955.**

Cité dans la Thèse d'Etat Paris RAPOPORT G., Paris, 1966.  
Z. Physiol. Chem., **300**, 1.

**BOSTFORD J.L., 1981**

Cyclic nucleotides in procaryotes.  
Microbiol. Rev., **45**, 620.

**BOSWELL V.R., STEINBAUER C.E., BABB M.F., BURLISON W.L., ALDERMAN W.H. et SCHOTH H.A., 1936.**

Studies of the culture and certain varieties of the Jerusalem artichoke.  
U.S. Dept. Agric. Tech. Bull., n° 514.

**BOURDU R., 1963.**

Inuline et oligosaccharides dans les Akenes en germination de Dahlia.  
Physiol. veg., **1**, 77.

**BRADBURY I.K. et HOSFA G., 1976.**

Assimilates distribution patterns and carbohydrate concentration changes in organs of *Solidago canadensis* during an annual developmental cycle.  
Can. J. Bot., **55**, 1121-1127.

**BRADFORD M.M., 1976.**

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal. Biochem., **72**, 248.

**BUFFA M., CONGLU G., LOMBARD A., TOURN M.L., 1980.**

A homologous series of non-reducing oligosaccharides in *Artemisia absinthum L.* roots.  
J. Chromatogr., **200**, 309.

**BYUN S.H. et NAHM B.H., 1978.**

Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis.  
J. Food Sc. **43**, 1871.

**Centre d'Etude et de Recherche Technologiques des Industries (C.E.R.T.I.A.)**

Etude physico-chimiques de la racine fraîche de chicorée.  
Rapport d'activité, 1973.

**CHALLINOR S.W., HAWORTH W.N. and HIRST E.L., 1934.**

Polysaccharides. Part 17. The constitution and chain length of levan.  
J. Chem. Soc., 676.

**CHAUTARD P., GUIRAUD J.P. et GALZY P., 1981.**

Inulinase activity of *Pichia polymorpha*.  
Acta Microbiologica, Academiae Scientiarum Hungaricae, 28, 245.

**CHOLET R. et ANDERSON L.L., 1977.**

Conformational changes associated with the reversible cold inactivation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase.  
Biochim. Biophys., Acta, 482, 228.

**CHUBEY B.B. et DORREL D.G., 1977.**

A Chicory, another potential fructose crop.  
J. Inst. Can. Sc. Technol. Alim., 10, 331.

**COHEN-BAZIRE G. et JOLIT M., 1953.**

Isolement par sélection de mutants d'*Escherichia coli*.  
Ann. Inst. Pasteur, 84, 937.

**COLIN H., 1942.**

Les glucides du topinambour.  
Bull., Assoc. Chim., p. 179.

**COLLINS F.W., CHANDORKAR K.R., 1973.**

De novo synthesis of fructo oligosaccharides in leaf disks of certain *Astereaceae*.  
II. Certain physiological and biochemical changes accompanying fructo oligosaccharide formation.  
Can. J. Bot., 51, 1931.

**COLMAN G., 1967.**

Studies on the regulation of extracellular enzyme formation by *Bacillus subtilis*.  
J. Gen. Microbiol., 49, 421.

**CORI G.T., CORI C.F. et GREEN A.A., 1943.**

Cité par R. DEDONDER dans Traité de Biochimie, tome III, Ed. Masson & Cie.  
Synthèse et dégradation des homopolysides.  
J. Biol. Chem., 151, 21.

**CUGNAC A., 1931.**

Les glucides des graminées. Importance des fructoholosides.  
Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 125.

**DACOSTA T. and GIBONS R.J., 1968.**

Hydrolysis of levan by human plaque streptococci.  
Arch. Oral. Biol., **13**, 609.

**DARBYSHIRE B. et HENRYR.J., 1968.**

The metabolism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified  
in *Heliantus tuberosus*.  
New Phytologist, **67**, 517.

**DAVIS P.J., 1964.**

Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., **121**, 404.

**DEDONDER R., 1952.**

Les glucides du topinambour. 3. Synthèse du glucofructosane in vitro par  
des extraits de divers organes de topinambour.  
Bull. Soc. Chim. Biol., **34**, 171.

**DEDONDER R. et SLIZEWICZ P., 1958.**

Etudes sur les levanes produits par *Bacillus subtilis* 2. Propriétés physiques et  
poids moléculaires des levanes natifs de leurs produits d'hydrolyse-acide  
ménagée.  
Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 873.

**DEDONDER R., 1961.**

Les glucides du topinambour.  
Thèse, Paris.

**DEDONDER R. et Mme NOBLESSE, 1953.**

Mise en évidence de produits intermédiaires contenant du glucose dans la  
synthèse des levanes par *Bacillus subtilis*.  
Ann. Inst. Pasteur, **85**, 356.

**DEMEULES S., GUIRAUD J.P. et GALZY P., 1981.**

Study of inulinase from *Debaryomyces phaffii*.

Zeitschrift Allg. Microbiol., **21**, 181.

**DIXON M., 1953 (a).**

Nomogram from ammonium sulfate solutions.

In "Methods in enzymol.". S.P. Colowick and Kaplan W.O. ed., Acad. Press, New-York, **11**, 76.

**DIXON M. et WEBB E.C., 1964.**

Enzymes, 2e ed.

Acad. Press, Ed., N.Y.

**DORREL D.G. et CHUBEYB.B., 1977.**

Irrigation, fertiliser, harvest dates and storages effects on the reducing sugar and fructose concentrations of Jerusalem artichoke tubers.

Canad. J. Plant. Sci., **57**, 591.

**EDELMAN J. et BACON J.S.D., 1951.**

The action of a hydrolytic enzyme system from *Helianthus tuberosus* on carbohydrates present in the tubers.

Biochem. J., **93**, 148.

**EDELMAN J., DICKERSON A.G., 1966.**

The metabolism of fructose polymers in plants.

Biochem. J., **98**, 787.

**EDELMAN J. et JEFFORD T.G., 1964**

The metabolism of fructose polymers in plants 4- $\beta$  fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus*.

Bioch. J., **93**, 148.

**EDELMAN J. et JEFFORD T.G., 1968.**

The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*.

New Phytologist, **67**, 517.

**ELORZA V., VILLANUEVA J.R. et SENTANDREU R., 1977.**

The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochim. Biophys. Acta, **475**, 103.

**FEINGOLD D.S., AVIGAD G. and HESTRIN S., 1956.**

The mechanism of polysaccharide production from sucrose 4. Isolation and probable structures of oligosaccharide formed from sucrose by levane-sucrase system.

Biochem. J., **64**, 351.

**FEINGOLD D.S. et GEHATIA M., 1957.**

The structure and properties of levan, a polymer of D-fructose produced by cultures and cell-free extracts of *Aerobacter levanicum*.

J. Polymer Sci., **23**, 780.

**FIALA V., JOLIVET E., 1980.**

The aptitude of roots of Witloof chicory for chicon production studied by their carbohydrate composition.

Scientia Hort., **13**, 125.

**FISCHER E.H., KOHTES L. et FELLING J., 1951.**

Propriétés de l'invertase purifiée.

Helv. Chim. Acta, **34**, 1132.

**FISCHER E.H. et STEIN E.A., 1964.**

The enzymes, 2e ed., Acad. Press. Ed., N.Y., **4**, 313.

**FLEMING S.E. et GROOTWASSINK J.W.D., 1979.**

Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke. C.R.C.-C.R.I.T., Rev. Food. Sc. Nut., **11**, 1.

**FLOOD A.E., RUTHERFORD P.P. et WESTON E.W., 1970.**

The response of chicory root times disks to treatment with 2,4- and 3,5-dichlorophenoxy-acetic acids.

Phytochemistry, **9**, 2431.



**FRANCOIS L., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., 1962.**

Cité dans monographie de Montreuil J. et Spik G.  
Biochem., **83**, 335.

**FRIIS J. et OTTOLENGHI P., 1959.**

Localization of invertase in a strain of yeast.  
C.R. Carlsb. Lab., **31**, 259.

**FUCHS A., 1959**

On the synthesis and break down of levan by bacteria.  
Ph. D. Thesis, University of Leiden.

**GASCON S., NEUMANN N.P. et LAMPEN J.O., 1968.**

Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast.  
J. Biol. Chem., **243**, 1573.

**GASSON S. et OTTOLENGHI P., 1972.**

Influence of glucose concentration of the medium on the invertase content of a strain of *Saccharomyces* bearing the suc 2 GENE.  
Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg, **39**, 15.

**GENSHIRO KAWAI H., TANIGUCHI et MICHINORI NAKUMARA, 1973.**

Polyfructans and oligofructans synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* Lam 2544.  
Agr. Biol. Chem., **37**, 2111.

**GILBERT V.E. et STACEY M., 1948.**

The constitution of a levan produced from sucrose by *Pseudomonas mors-prunorum* (Wormald).  
J. Chem. Soc., 1560.

**GORDAN A.J., FLOOD A.E., 1979.**

Effect of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid on invertases in chicory root.  
Phytochemistry, **18**, 405.

**GREENWOOD C.T. and MILNE E.A., 1968.**

Starch degrading and synthesizing enzymes. In advances in carbohydrate chemistry.

Vol. 23, ed. by M.L. Wolfrom, Acad. Press, New-York and London, p. 281.

**GROTELUESCHEN R.D., SMITH D., 1968.**

carbohydrate in grasses. 3. Estimation of degree of polymerisation in the stem bases of timothy and bromegrass at seed maturity.

Crop Sci., **8**, 210.

**GROOTWASSINK J.W.D. et FLEMING S.E., 1980.**

Non specific  $\beta$  fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Batch and continuous fermentation, single recovery method and some industrial properties.

Enzy. Microbiol. Technol., **2**, 45.

**GROOTWASSINK J.W.D. and HEWITT G.M., 1983.**

Inductible and constitutive formation of  $\beta$  fructofuranosidase (inulinase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*.

Journal of general Microbiology, **129**, 31.

**GUIRAUD J.P., 1981.**

Enzymatic hydrolysis of plant extracts containing inulin.

Enzyme Microb. Technol., **3**, 305.

**GUIRAUD J.P., 1981.**

Utilisation des levures pour la valorisation industrielle de polyfructosanes de type inuline.

Thèse de Docteur d'Etat, U.S.T. du Languedoc.

**GUIRAUD J.P., BERNIT C. and GALZY P., 1982.**

Inulinase of *Debaryomyces cantarellii*.

Folia Microbiol., **27**, 19.

**GUIRAUD J.P., DAURELLES J. et GALZY P., 1981.**

Alcohol production from Jerusalem artichoke using yeasts with inulinase activity.

Biotechnol. Bioeng., **23**, 1461.

**GUIRAUD J.P. et GALZY P., 1981.**

Production de fructose par hydrolyse chimique de l'inuline.

Rev. Ind. Agric. Alimen., **98**, 45.

**HABER E.S., GAESSLER W.G. and HIXON R.M., 1941.**

Levulose from chicory, dahlia and artichokes.

Iowa ST. Coll. J. of Science, **16**, 291.

**HAMMER H., 1970.**

Oligo- and polyfructosides from the bulbs of two leucojum species.

Acta Chem. Scand., **24**, 1294.

**HANES C.S., 1940.**

Cité par R. DEDONDER, traité de Biochimie Générale, Ed. Masson et Cie, Proc. Roy. Soc., **128**, 421.

**HANSEN S.A., 1974.**

Thin-layer chromatographic method for identification of oligosaccharides in starch hydrolyzates.

J. Chromatogr., **105**, 388.

**HANSEN S.A., 1975.**

Thin-layer chromatographic method for identification of mono-, di- and tri-saccharides.

J. Chromatogr. , **107**, 224.

**HARDER W., 1979.**

Regulation of the synthesis of extracellular enzymes.

Symp. Dublin, sept. 1979.

**HARWORTH W.N. et LEARNER A., 1928.**

La structure de l'inuline.

J. Chem. Soc., 131, 619.

**HAWORTH W.N., HIRST E.L. et PERCIVAL E.G.V., 1932.**

Polysaccharides. XV. The molecular structure of inulin.

J. Chem. Soc., p. 2384.

**HEDRICK J.L. et SMITH A.J., 1968.**

Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.

Arch. Biochem. Biophys., 126, 155.

**HEHRE E.J., CALSON J. et NEIL, 1947.**

Synthesis of a polysaccharide of the starch-glycogen class from sucrose by a cell-free bacterial enzym system.

J. Biol. Chem., 177, 267

**HEMMI F. et TOMITA H., 1943.**

Utilization of materials rich in inulin. preparation of fructose sweetening agent from *Helianthus tuberosus*.

J. Agric. Chem. Soc., 19, 816.

**HESTRIN S. et GOLDBLUM J., 1953.**

Levanpolyase.

Nature, 172, 1046.

**HESTRIN S. and AVINERI-SHAPIRO S., 1944.**

The mechanism of polysaccharide production from sucrose.

Biochem. J., 38, 2.

**HESTRIN S., AVINERI SHAPIR S. and ASCHNER M., 1943.**

The enzymic production of levan.

Biochem. J., 37, 450.

**HESTRIN S., FEINGOLD D.S. and AVIGAD G., 1956.**

The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levan sucrose from *Aerobacter levanicum*.

Biochem. J., 64, 340.

**HE WITT G.M. and GROOTWASSINK J.W.D., 1984.**

Stimultaneous production of inulinase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*.

Enzyme, Microb. Technol., 6, 263.

**HIBBERT H. and BRAUNS F., 1931.**

Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides 36. Structure of the levan synthesized by the action of *Bacillus subtilis* on sucrose.

Can. J. Research, 4, 596.

**HIRST E.L., Mac GILVRAY D.I. et PERCIVAL E.G.V., 1950.**

Studies on fructosans. I. Inulin from dahlia tubers.

J. Chem. Soc., p. 1297.

**HIRST E.L., 1957.**

Some aspects of the chemistry of the fructosans.

Proc. Chem. Soc., 7, 193.

**HOCHE B., 1926.**

Production industrielle de levulose.

Z. Ver. Dtsch. Zucker, 76, 821.

**HORTON D. et WELFROM, 1963.**

Polysaccharides, section a, dans comprehensive Biochemistry.

Florkin et Stotz, 13, Elsevier Publ. Company, Amsterdam.

**INGLMAN B. and SIEGBAHN K., 1944.**

Dextran and levan molecules studied with the electron-microscope.

Nature, 154, 237.

**INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE, 1982.**

Production de carburants liquides par fermentation à partir du topinambour.

Rapport d'activité.

**JAYASANKAR N.P., GRAHM P.H., 1969.**

An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microorganism.

Can. J. Microbiol., 16, 1023.

**KANAYA K., CHIBA S., SHIMOMURA T., 1978.**

Thin layer chromatography of linear oligosaccharide.  
Agric. Biol. Chem., **42**, 1947.

**KIERSTAN M.P.J., 1978.**

Production of fructose syrups from inulin containing plants.  
Biotchnol. Bioeng., **16**, 609.

**KIERSTAN M.P.J., 1980.**

Production of fructose syrups from inulin.  
Process Biochem., **5**, 2.

**KIESSLING W., 1939.**

Cité par DEDONDER dans traité de Biochimie tome III. Biosynthèse et dégradation des homopolysides.  
Biochem. **2**, **302**, 50.

**KIM-KI-CHOUL, 1975.**

Studies on the hydrolysis of inulin in Jerusalem artichoke by fungal inulase.  
Hanguk Nanghuahakhoe, Chi, **18**, 117.

**KOSLAND D.E., 1960.**

Molecular forms of yeast invertase.  
Adv. in Enzym., **22**, 45.

**KOVALJOVA N.S. et YURKEVICH V.V., 1973.**

Regularities of sucrose and inulin hydrolysis by  $\beta$  fructosidase from *Saccharomyces lactis*.  
VEST. Moskov. Univ. (Botan), **1**, 37.

**KUNBAUCH W., 1974.**

Caractéristique du fructosane de *Dactylis glomerata*.  
Z. Acker und P.F. Lanzenbau, **139**, 85.

**LELOIR L.F., OLAVARRIA J.M. et CARMINATTI H., 1959.**

Cité par DEDONDER. Traité de Biochimie, Tome III.  
Arch. Bioch. Biophys., **81**, 508.

**LENEWEAVER H. et BURK D., 1934.**

The determination of enzyme dissociation constants.  
J. Am. Chem. Soc., 56, 658.

**LEPESANT J.A., DEDONDER R.,**

Isolement et caractérisation de mutants du système métabolique du saccharose chez *Bacillus subtilis*.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 266, 1442.

**LINDBERG B., LONNGREN J. et THOMPSON J.L., 1973.**

Methylation studies on levans.  
Acta Chem. Scand., 27, 1819.

**LOEWENBERG J.R. and REESE E.T., 1957.**

Observations on microbial fructosans and fructosanases.  
Can. J. Microbiol., 3, 643.

**LOWRY O.H., ROSENBROUG N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951.**

Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 193, 265.

**LYNE R.R., PEAT S. and STACEY M., 1940.**

Polysaccharide. Part 39. The constitution of certain levans formed by bacterial action.  
J. Chem. Soc., 237.

**MARAIS B. SLACKJIAK M. et MOSCHETTO Y., 1981.**

Mesure photométrique et micro-informatique. Exemple d'intégration d'un microprocesseur dans un dispositif de photométrie adapté à la microbiologie.  
Innov. Tech. Biol. Med., 3, 309.

**MARGARITIS A., BAJPAI, P., WALLAGE J., 1981.**

Ethanol fermentation in a continuous tower fermentor.  
Biotechnol. let., 3, 613.

**MARILLER C., 1943.**

Expériences sur les topinambours.  
Bull. Ass. Chim., 60, 186.

**MATTOON J.R., HOLMLUND C.E., SCHEPÁRTZ S.A., VAVRA J.J. and JOHNSON M.J., 1955.**

Bacterial levans of intermediate molecular weight.  
Applied Microbiol., 3, 345.

**Mc DONALD E.J., 1946.**

Polyfructosanes and difructose anhydrides.  
Adv. Carbohydr. Chem., 2, 253.

**MEERS J.L., 1972.**

The regulation of  $\alpha$  amylase production in *Bacillus licheniformis*.  
Antonic van Leeuwenhoek, J. Microbiol., Serol., 38, 585.

**MENCIER F., 1972.**

Méthode simple et rapide de mise en évidence de microorganismes producteurs de dextranase.  
Ann. Inst. Pasteur, 122, 153.

**METZENBERG R.L., 1963.**

The structure and properties of invertase synthesized by a *Neurospora crassa*.  
Arch. Biochem. Biophys, 100, 503.

**MIDDLETON E., 1975.**

The molecular configuration of inulin.  
J. Memb. Biol., 34, 93.

**MILLER C.H. and SOMERS P.J.B., 1978.**

Degradation of levane by *Actinomyces viscosus*.  
Infection and Immunity, 22, 266.

**MILLER D.L., 1975.**

Ethanol fermentation and potential.  
Biotechnol. Bioeng., 5, 345.

**MOHINDERJIT S., SIDHU and SANDHU D.K., 1984.**

Production and localization of  $\beta$  glucosidase in *Trichoderma harzianum* and some aspect of catabolite repression.  
Can. J. Microbiol, 30, 1377



**MOULE C., TSVETOUKHINE V., DUPUIS G. et RENAULT M., 1967.**

Contribution à l'étude du topinambour ensilage.

I.N.R.A., SEI, n° 31.

**MOULE C., 1972.**

Phytotechnie spéciale. T3. Plantes sarclées et diverses.

Ed. La Maison Rustique, Paris.

**MURPHY D., 1952.**

Structure of a levan produced by *Bacillus polymyxa*.

Can. J. Chem., **30**, 872.

**NAHM B.H. et BYUN S.M., 1977.**

Purification and characterisation of inulase from *Kluyveromyces fragilis*.

Korean Biochem. J., **10**, 95.

**NAKAYAMA M. et COLL., 1983.**

Effects of some substances on the formation of inulin fructotransferase in *Arthrobacter ureafaciens*.

Agric. Biol. Chem., **47**, 2761.

**NAKUMURA T., NAKATSU S., 1977.**

General properties of extracellular inulase from *Penicillium*.

Nippon Nogei Kagakukaishi, **51**, 681.

**NAKUMURA T., KUROKAWA T., NAKATSU S. et UEDA S., 1978 (a)**

Crystalization and general properties of an extracellular inulinase from *Aspergillus sp.*

Nippon Nogei Kagakukaishi, **52**, 681.

**NAKAMURA T., MARUKI S., NAKATSU S. et UEDA S., 1978 (b)**

General properties of an extracellular inulase from *Aspergillus*.

Nippon Nogei Kagakukaishi, **52**, 581.

**NARISAMA, S. and YAMAMATO U., 1974.**

Regulatory factors affecting  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*.  
J. Bacteriol., 121, 848.

**NEGORO H. et KITO E., 1973 (a)**

$\beta$  - fructofuranosidase from *Candida kefyr*.  
J. Ferment. Technol., 51, 96.

**NEGORO H. et KITO E., 1973 (b)**

Purification and enzymatic properties of intracellular  $\beta$  fructofuranosidase from  
*Candida kefyr*.  
J. Ferment. Technol., 51, 103.

**NEGORO H., 1978.**

Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*.  
J. Ferment. Technol., 56, 102.

**NEUMAN N.R. et LAMPEN J.O., 1967.**

Purification and properties of yeast invertase.  
Biochem., 6, 468.

**NORMAN A.G., 1936.**

The composition of forage crops. I. Raye grass.  
Biochem., J., 30, 1354.

**OTA N., INOUE M. et MINO Y., 1979.**

Inulin in medicinal plants. I. Determination of inulin in medicinal plants  
by X-ray diffractometry.  
Chem. Pharm. Bull., 27, 2997.

**PALMER A., 1951.**

The specific determination and detection of glucose as a probable constituent  
radical of certain fructosans by means of rotatrin.  
Biochem., J., 48, 389.

**PAZUR J.H., KIEPPE K. et BALL. E.M., 1963.**

The glycoprotein nature of some fungal carbohydrates.  
Arch. Biochem. Biophys., 103, 515.

**PEAUD-LENOEL C., 1956**

Mécanisme d'action de la levane sucrase de *Bacillus subtilis*. Complexe enzyme-levane.

Compt. Rend., **242**, 1772.

**PHELPS C.F., 1965.**

The physical properties of inulin solutions.

Biochem. J., **95**, 41.

**PHILIPS D.E. et RUTHERFORD P.P., 1976.**

Some enzyme changes in chicory (*Cichorium intybus*) during forcing.

Ann. Appl. Biol., **84**, 251.

**POLLOCK C.J., HALL M.A. et ROBERTS D.P., 1979.**

Structural analysis of fructose polymers by gaz liquide chromatography and gel filtration.

J. Chromatogr., **171**, 411.

**PONTIS H.G., 1968.**

Separation of fructosans by gel filtration.

Anal. Biochem., **23**, 331.

**PONTIS H.G., 1966.**

Observations on the de novo synthesis of fructosans in vivo.

Archs. Biochem. Biophys., **116**, 416.

**PUNJ M.L., KOCHAR A.S. et BHATIA I.S., 1970.**

Degradation and metabolism of inulin by rumen microorganisms.

Ind. J. Nutr. Diet., **7**, 247.

**REJ R. et RICHARDS A.H., 1974.**

Interference by tris buffer in the estimation of protein by the Lowry procedure.

Anal. Biochem., **62**, 240.

**ROSE V., 1953.**

Neues Allgem. J. Chem. (Gehlens) **3**, 217 - Cité par : Whistler R.L. et Smart C.L. dans : Polysaccharide chemistry, Acad. Press, p. 277.

**RUTHERFORD P.P. et PHILLIPS D.E., 1970.**

The variation of invertase and hydrolase activities of chicory roots during cold-storage and significance of these changes to chicory development.

SYMP. Sect. Horticole Eucarpia, Gembloux, Belgique, p. 207.

**RUTHERFORD P.P. et PHILLIPS D.E., 1975.**

Carbohydrate changes in chicory during forcing.

J. Hort. Sci., 50, 463.

**RUTHERFORD P.P. et WESTON E.W., 1968.**

Carbohydrate changes during cold storage of some inulin containing roots and tubers.

Phytochem. 7, 175.

**RUTHERFORD P.P. et DEACON A.C., 1972 (a)**

$\beta$  fructofuranosidases from roots of Dandelion.

Biochem. J., 126, 569.

**RUTHERFORD P.P. et DEACON A.C., 1972 (b)**

The mode of action of Dandelion roots  $\beta$  fructofuranosidases on inulin.

Bioch. J., 129, 511.

**RUTHERFORD P.P., 1981.**

Some biochemical changes in vegetables during storage.

Ann. Appl. Biol., 98, 538.

**SATYANARAYANA M.N., 1976.**

Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in a gawe vera cruz. Part. II Biosynthesis of oligosaccharides.

Indian J. Biochem. Biophys., 13, 398.

**SAITO N. and YAMAMOTO X., 1975.**

Regulatory factors affecting  $\alpha$  amylase production in *Bacillus licheniformis*.

Journal of Bacteriology, 121, 848.

**SCHAEFFER P., 1969.**

Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins.

Bacteriol. Rev., 33, 48.

**SCOPES R.K., 1973.**

Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm.  
Anal. Bioch., **59**, 277.

**SCOTT R.W. et EDELMAN J., 1966.**

Sucrose fructosyl transferase from higher plant tissues.  
Biochem. J., **100**, 238.

**SIDHU M.S. and SANDHU D.K., 1984.**

Production and localisation of  $\beta$  glucosidase in *Trichoderma harzianum* and some aspects of catabolite repression.  
Can. J. Microbiol., **30**, 1377.

**SINGH R., BHATIA I.S., 1971.**

Isolation and characterisation of fructosyl transferase from chicory roots.  
Phytochem., **10**, 495.

**SHIRAHASHI K., HAYAKAWA S. and SUGIYAMA T., 1978.**

Cold lability of pyruvate orthophosphatedikinase in the maize leaf.  
Plant Physiol., **62**, 826.

**SMITH D., 1973.**

Polysaccharide reserves.  
Dans : Simple cell. Protein II. Tannenbaum S.R. et Wang D.I.C., MIT ed.  
Cambridge, p. 158.

**SNYNDER H.E. et PHAFF H.J., 1960.**

Studies on a  $\beta$  fructosidase produced by *Saccharomyces fragilis*.  
Anton. Van Leeuwenhoek, **26**, 433.

**SNYNDER H.E. et PHAFF H.J., 1962.**

The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin.  
J. Biol. Chem., **237**, 2438.

**SUZUKI M., 1968.**

Fructosan in the timothy haplocorn.  
Can. J. Bot., **46**, 1201.

**TANAKA K., UCHIYAMA T. et ITTO A., 1972.**

Formation of difructofuranose dianhydride from by an extracellular Inulinase II of *Arthrobacter*.

Biochim., Biophys. Acta, **284**, 248.

**TANAKA K., KAWAGUCHI H. and SHOHJI K., 1981.**

Enzymic formation of difructose anhydre IV from bacterial levan.

J. Biochem., **90**, 1545.

**TANRET C., 1893 (a)**

Sur l'inuline, la pseudo inuline et l'inulenine.

Bull. Soc. Chim., **9**, 200.

**TANRET C., 1893 (b)**

Sur l'inuline.

BULL. Soc. Chim., **9**, 227.

**TANRET C., 1893 (c)**

Sur les hydrates de carbones du topinambour.

Bull. Soc. Chim., **9**, 622.

**THEODOROPOULOS P., 1986.**

Le transport du glucose et sa régulation chez *R. meliloti*.

Thèse de Docteur en Biochimie, U.S.T. Lille.

**THOMAS C.J., 1960.**

Metabolism of the soluble carbohydrates of grasses in the rumen of the sheep.

J. Agric. Sci., **54**, 360.

**THOMSON T., 1818.**

A system of chemistry. Abraham small. Philadelphie **4**, 65, cité par Whistler dans : Polysaccharides chemistry, Acad. Press., p; 276.

**TOMASIC J., VENNINGS H.J. et GLAUDEMANS C.P.J., 1978.**

Evidence for a single type of linkage in a fructofuraman from *Lolium perenne*. Carbohydrate Research, **62**, 127.

**TOMODA M., NAGUMO S. et NAKATSUKA S., 1973 (a)**

Water soluble carbohydrates of *Ophiopogonis* tubers.  
Chem. Pharm. Bull., 21, 659.

**TOMODA M., SATON N. et SUGIYAN A., 1973 (b)**

Isolation and characterisation of fructans from *Polygonatum odoratum* rhizomes.  
Chem. Pharm. Bull., 21, 1806.

**TORAN-DIAZ, 1983.**

Production d'alcool par *Z. mobilis*.  
Thèse de Docteur Ingénieur.

**TRENEL G., JOHN M. et DELLWEG H., 1968.**

Gel chromatographic separation of oligosaccharide at elevated temperature.  
FEBS Lett., 2, 74.

**TSVETOUKHINE V., 1960.**

Contribution à l'étude des variétés de topinambour.  
Ann. Amélior. Plantes, 3, 275.

**UCHIYAMA T., NIWA S. et TANAKA K., 1973.**

Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulinase. II.  
Biochim. Biophys. Acta, 315, 412.

**UCHIYAMA T., 1975.**

Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulinase II on several oligofructans bacterial levans.  
Biochim. Biophys. Acta, 397, 153.

**ULMANN A., 1985.**

Catabolite repression.  
Biochimie, 67, 29.

**VELICK S.P. et WICKS L.F., 1951.**

Cité dans la Thèse d'Etat, RAPOPORT George, Paris 1966.  
J. Biol. Chem., 190, 741.

**WAIN R.L., RUTHERFORD P.P. et CRIFFITHS C.M., 1964.**

Effet of growth regulating substance on inulin storing plant tissu.  
Nature, London, **203**, 504.

**WALLENFELS X., 1950.**

Über einen neuen nachweis reduziereuder zucker in papier chromatogramm  
and dessen quantitative. Auswertung.  
Naturwissenschaften, **37**, 491.

**WALKER N.E. and CAMPBELL L.L., 1963.**

De novo synthesis of  $\alpha$  amylase by *Bacillus stearothermophilus*.  
J. Bacteriol., **86**, 1202.

**WALKER G.J. and MORREY-JONES J.G., 1983.**

Activity of fructanase in batch culture of oral streptococci.  
Carbohydr. Res., **113**, 101.

**WILLIAMS L.A. et ZIOBRO G., 1982.**

The production of ethanol by immobilized yeast cell.  
Biotechnol. Let., **4**, 45.

**WILFRED J., 1974.**

The cryptic  $\beta$  fructofuranosidase of *Saccharomyces rouxii*.  
J. Bacteriol., **120**, 887.

**WHISTLER R.L. and SMART C.L., 1953.**

Polysaccharide chemistry.  
Academic Press Inc., New-York.

**YURKEVICH V.V. et KOVALJOVA N.S., 1972 (a)**

Activité sur saccharose et inuline de la  $\beta$  fructosidase de *Kluyveromyces fragilis*.  
Acad. Nauk, U.R.S.S. (Bioch.), **207**, 1233.

**YURKEVICH V.V. et KOVALJOVA N.S., 1972 (b)**

$\beta$  fructosidases from yeast.  
Biol. Nauk (Nauk dokl-Vyshcol), **6**, 98.



**YURKEVICH V.V., KOVALJOVA N.S. et BAKER K.K., 1972.**

$\beta$  fructosidase from *Saccharomyces lactis*.

Acad. Nauk. U.R.S.S. (Biol., Rast), 19, 937.

**ZELIKSON R. et HESTRIN S., 1961.**

Limited hydrolysis of levan by a levanpolyase system.

Biochem. J., 79, 71.

**ZITTAN L., 1981.**

Enzymatic hydrolysis of inulin. An alternative way to fructose production. Presented at the 32 starch convention of the Association of Cereal Research at Detmold.

#### **COMMUNICATIONS PERSONNELLES**

**EL YACHIOUI M., HORNEZ J.P., OCHIN D. et TAILLIEZ R., 1986**

Production de la  $\beta$  fructofuranosidase extra cellulaire par une bactérie du sol.

Asociation A. TESSIER, Société de Microbiologie et Hygiène de l'Alimentation et de la Nutrition, Paris.

**EL YACHIOUI M., OCHIN D., HORNEZ J.P. et TAILLIEZ R., 1986**

Purification et propriétés de la  $\beta$  fructofuranosidase extracellulaire chez une bactérie du sol.

11e Colloque Soc. Fr. Microbiol., Toulouse (3-5 Avril 1986)

Publ. in Procceedings, Bioreactors, pp 207- 214.



## RESUME

Dans le cadre de la valorisation de racines d'endive après forçage, qui contiennent encore une quantité très importante d'inuline (15 à 25 % de la matière sèche), nous avons recherché chez les bactéries une enzyme capable d'hydrolyser ce polymère.

Une  $\beta$  fructofuranosidase extracellulaire a été extraite des milieux de culture d'une bactérie du sol ; cette enzyme a une spécificité large, elle est active sur plusieurs  $\beta$  fructosides (inuline, raffinose et saccharose). La synthèse de l'enzyme est induite par l'inuline et à moindre degré par les autres  $\beta$  fructosides ; elle s'effectue régulièrement au cours de la croissance bactérienne et l'optimum est obtenu en fin de phase exponentielle.

La synthèse de l'enzyme est inhibée en présence de glucose. Nous avons isolé après utilisation de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (N.T.G.) un mutant résistant à cet effet glucose, dont la production d'enzyme est de plus améliorée.

L'enzyme a été purifiée par relargage suivi d'une séparation chromatographique classique.

Ses propriétés physico-chimiques ont été mesurées ( $K_m$ , activité = f (pH), activité = f ( $t^\circ$  C), rôle des effecteurs, poids moléculaire, etc...).

L'étude de la possibilité d'utiliser l'enzyme décrite, pour la production du fructose à partir des extraits racinaires riches en inuline, a montré que l'enzyme est adaptée à cet objectif.

