

Evolution du degré de méthylation des pectines de capitule de tournesol en fonction de la maturité

V. MARECHAL¹, L. RIGAL¹, J. RAYNAL², G. ALIBERT³

¹Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle U. A. INRA 31A1010 ENSCT INPT 118 rte Narbonne 31077 cedex Toulouse France and ²Laboratoire Industrie Alimentaire ENSAT INPT, ³Laboratoire de Biotechnologie et d'amélioration des plantes U.A. INRA 31939222 ENSAT INPT 145 av. Muret 31076 Cedex 4 Toulouse France.

L'évolution de la quantité et de la nature des pectines de capitule de tournesol ainsi que l'activité des pectines-méthyl estérases sont étudiées au cours du développement de la plante. L'analyse est effectuée sur trois hybrides de tournesol différents, cultivés sur deux types de terrain en 1994 et en 1995. Les échantillons ont été prélevés à sept stades de développement, allant du capitule à demi ouvert au capitule sec lors de la récolte. Les analyses montrent que quelle que soit la variété, l'année et le type de sol, les pectines évoluent de manière identique. La teneur en pectines augmente jusqu'à l'inclinaison du capitule (maximum : 6,1g par capitule qui équivaut à 4,2g d'acides galacturoniques par capitule), reste constante, puis diminue légèrement lors de la phase de séchage sur pied. Le degré de méthylation voisin de 50% diminue à 40% lors de l'inclinaison du capitule puis chute à 20% aux stades de sénescence de la plante. Parallèlement, l'activité des pectines-méthyl estérases est multipliée par 1,5 au premier stade de modification du degré de méthylation, puis augmente de façon quasi exponentielle en fin de culture. Cette forte augmentation de l'activité des pectines-méthyl estérases pourrait expliquer le faible degré de méthylation des pectines extraites du capitule après récolte.

We have studied the evolution of the nature and the quantity of the sunflower head pectin and pectinmethylesterase activity during the plant's growing. The analyses were made on three different sunflower hybrids. These hybrids were cultivated in two different types of soils in 1994 and 1995. The samples were taken at seven physiological stages from the semiopen head to the dry head. The analyses showed that the pectins evolution is the same for the different hybrids, different years and different soils. The pectin amount increases up to the head inclination (max. 6.1 g per head correspond to 4.2 g of galacturonic acid per head). After inclination there is a stage where the pectin amount remains stable. After this stage, the pectin amount decreases during the drying period of the plant before harvest. The methoxy content decreases from about 50% to 40% during the inclination of the head. After this stage the methoxy content decreases to 20% during the senescence of the plant. In the same way, the pectinmethylesterase activity increases like an exponential at the end of the maturation. The high increase of pectinmethylesterase activity could explain the low methoxy content of the pectins extracted from the head after harvest.

Le capitule de tournesol est l'une des matières premières les plus riches en pectines (Bishop 1955, Stoikoff 1948, Shewfelt et Worthington 1953, Riaz et Uddin 1972, Lin et Col. 1975) avec une teneur de 20 à 25 % selon les cultivars, quantité comparable à celle des marcs de pommes (15 à 20%), ou des écorces des agrumes : 30 à 35% (Neukom 1967).

Les pectines extraites des capitules de tournesol secs présentent un degré de méthylation (DM) faible : 39% pour les capitules de tournesol, contre 55% pour la pulpe de betterave, 62,5% pour la pomme, 67% pour les agrumes (Zitko et Bishop 1965). A DM égal, elles permettent de former des gels de moins bonne qualité que les pectines issues de ces plantes et déméthylées par voie chimique. Leur faible DM étant dû à une déméthylation enzymatique intervenant avant la récolte (Campbell et Col. 1978, Pathak et Shukla 1981, May 1990), les groupements méthylés restants ne sont pas répartis uniformément sur la molécule. Il apparaît dans le gel des zones méthylées et des zones non méthylées qui confèrent au gel une certaine fragilité et une grande sensibilité aux conditions ioniques (Kim et Sosulski 1978). La déméthylation enzymatique intervenant en fin de récolte, le degré de méthylation des pectines n'est pas constant d'une récolte à l'autre. Parallèlement, dans les conditions normales de récolte, la matière première n'est pas suffisamment acide pour inhiber l'action des enzymes pectolytiques. Campbell et Col. (1978) ont constaté une diminution du poids moléculaire des pectines de 120 000 à 80 000 durant le séchage de la plante. Ce qui a pour conséquence de lier le pouvoir gélifiant des pectines aux conditions de séchage de la plante.

Augmenter et contrôler l'évolution du DM des pectines du tournesol lors de sa maturation nécessite l'élucidation des processus responsables du faible DM. En fonction des données obtenues sur d'autres plantes (Sexton et Roberts 1982, Huber 1983), l'hypothèse selon laquelle des enzymes du type pectine-méthyl estérase (PME) synthétisées au cours de la maturation du capitule sont responsables de la déméthylation, apparaissait la plus vraisemblable. Ces recherches portent donc sur l'étude de la variation du contenu en pectines, de leur DM, et de l'activité des PME dans le capitule de tournesol en cours de développement.

MATERIEL ET METHODES

Les études ont été réalisées sur trois hybrides de tournesol (codés 1,2,3) cultivés dans le Gers (France) durant les années 1994 et 1995. Deux des hybrides récoltés en 1994 étaient cultivés sur un terrain argilo-calcaire semés, l'un précocement (hybride 1), l'autre plus tardivement (hybride 2), tandis que celui récolté en 1995 était cultivé sur une terre limoneuse (hybride 3). Les prélèvements ont été effectués dans tous les cas aux environs de 18 heures et le matériel conservé à -20°C. Dans les trois cas, les récoltes ont été effectuées non pas en fonction de l'âge de la plante mais du stade physiologique du capitule (tableau 1).

Les analyses ont été effectuées sur les capitules après élimination manuelle des graines. Les pectines sont extraites selon deux protocoles différents.

EXTRACTION A L'ACIDE CHLORHYDRIQUE EN UNE ETAPE. Les capitules sont décongelés puis introduits dans un réacteur contenant une solution d'HCl à pH 1,5 et maintenus 2 heures à 70°C sous agitation. Le mélange est ensuite filtré sur toile de coton. Les pectines contenues dans le filtrat sont précipitées par l'ajout d'éthanol (2V/V) et filtré sur toile de coton. Puis elles sont resolubilisées dans l'eau et l'éthanol entraîné est éliminé par évaporation sous vide partiel. Enfin les pectines sont lyophilisées.

EXTRACTION FRACTIONNEE. Les capitules, encore congelés, sont broyés puis introduits dans un réacteur maintenu à 70°C contenant de l'éthanol à 95%. Trois lavages successifs de 15 minutes sont effectués sous agitation. Le matériel insoluble à l'alcool subit

trois extractions successives de 30 minutes à l'eau à 20°C. Les filtrats aqueux sont mélangés et concentrés. Les pectines sont récupérées après deux séquences de purification : précipitation dans l'éthanol / resolubilisation dans l'eau, selon le protocole ci-dessus. Le résidu non soluble dans l'eau est traité pendant 1 heure à 70°C par un mélange d'oxalate d'ammonium et d'acide oxalique à pH 3. Le filtrat est récupéré et les pectines précipitées à l'éthanol, puis resolubilisées dans une solution d'HCl pH 1,5 et de nouveau précipitées à l'éthanol. Ce traitement est répété une fois, pour éliminer les sels d'oxalate formés pendant l'extraction, avant resolubilisation dans l'eau et lyophilisation des pectines purifiées. Finalement, le résidu non soluble dans l'oxalate est repris par une solution d'HCl pH 1,5, et traité pendant 2 heures à 70°C. La récupération des pectines se fait de la même façon que celles extraites à l'eau.

Le pourcentage d'acide galacturonique (AGA) des pectines est déterminé selon la méthode de Blumenkrantz et Absoehansen (1973). Les pectines sont hydrolysées à chaud par de l'acide sulfurique concentré mélangé à du tétraborate de sodium. Le dosage se fait par spectrophotométrie à 520 nm.

Le DM est déterminé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) selon un protocole adapté de Bartolome et Hoff (1972).

L'activité des PME est déterminée à partir d'un extrait enzymatique obtenu par broyage dans du tampon phosphate 1M à pH 7,5 contenant 5mM de 1,1-bis (p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane et 5%(p/v) de polyvinylpyrrolidone. La suspension est agitée pendant 20 minutes à 4°C, puis centrifugée à 47 000g pendant 30 minutes. Le surnageant est congelé et conservé à -20°C. Le milieu de la réaction enzymatique est obtenu par mélange de 0,6ml d'extrait enzymatique dilué deux fois dans du tampon phosphate 0,2M à pH 7,5 et 5,4ml de pectines commerciales (DM=68%) filtrées à 0,5%(p/v) dans le même tampon. Le mélange est mis à incuber à 35°C et des prélèvements sont effectués après 0, 15 et 30 minutes d'incubation. Pour chacun des échantillons, le méthanol libéré est mesuré par CPG après transformation en ester nitreux, tel que décrit précédemment.

RESULTATS

La teneur en pectines est déterminée selon deux protocoles différents d'extraction. Le premier, avec l'acide chlorhydrique (figure 1), est classiquement utilisé pour extraire les pectines dans l'industrie. Il est rapide et permet d'extraire la quasi totalité des pectines de DM élevé, mais il est peu efficace pour extraire les pectines de faible DM (Shewfelt 1953, Lin et Humbert 1976). Le second est un protocole d'extraction fractionnée, par l'eau, l'oxalate d'ammonium puis l'acide chlorhydrique (tableau 2). L'oxalate d'ammonium est un agent séquestrant qui permet, par fixation des ions Ca^{2+} , de libérer les pectines faiblement méthylées (Shewfelt 1953, Lin et Humbert 1976, Sabir et col. 1976). Ainsi, avec ce protocole qui utilise des extractants de nature différente, la quasi totalité des pectines, quel que soit leur DM, peut être récupérée. La mise en œuvre parallèle de ces deux protocoles permet de mettre en évidence l'évolution de la nature des pectines du capitule durant la croissance et la maturation de la plante. Celle-ci sera confirmée par la détermination de la teneur en AGA et du DM. Pour chaque fraction extraite la teneur en AGA, qui traduit le caractère acide polygalacturonique de la pectine, peut être considérée comme un indice de pureté de la fraction.

N°	stades physiologiques
1	capitule à demi ouvert
2	capitule totalement ouvert
3	capitule totalement ouvert, pétales de la couronne fanés
4	capitule incliné, dos vert
5	capitule incliné, dos jaune
6	capitule incliné, dos jaune-marron, sépales complètement secs
7	capitule totalement sec, après moisson

Tableau 1 : Stades physiologiques des capitules de tournesol prélevés

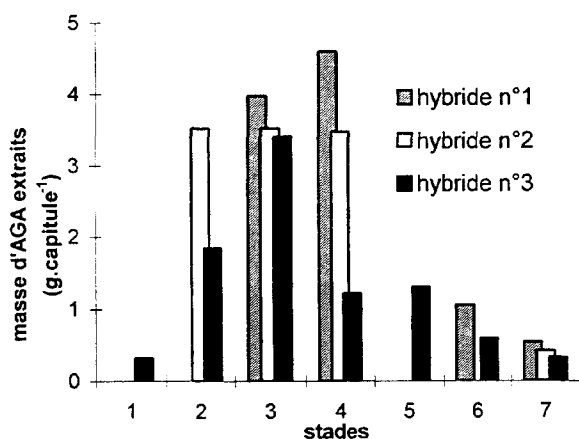


Figure 1 : Evolution de la quantité de pectines extraites des capitules des hybrides 1, 2 et 3 par le protocole à l'HCl seul

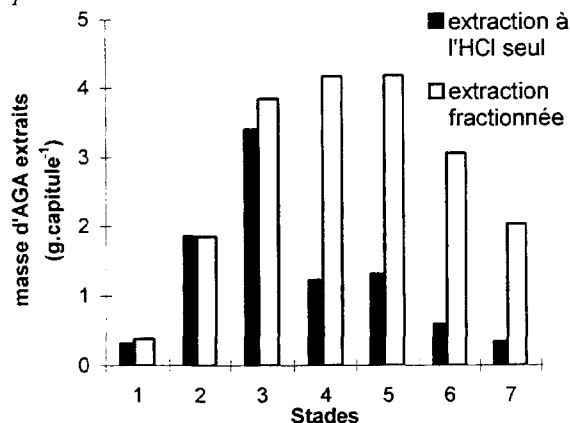


Figure 2 : Comparaison de la quantité de pectines extraites des capitules de l'hybride 3 par les deux protocoles

stade		extraction fractionnée			total extrait
		H ₂ O	Ox	HCl	
1	m. (g.cap. ⁻¹)	0,08	0,50	0,08	0,66
	rendement en %	2,5	15,6	2,5	20,6
	% A.GA.	44	59	51	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,04	0,30	0,04	0,37
	DM en %	45	45	37	
2	m. (g.cap. ⁻¹)	0,79	1,20	0,83	2,82
	rendement en %	6,0	9,2	6,3	21,5
	% A.GA.	53	73	68	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,41	0,87	0,57	1,85
	DM en %	49	49	43	
3	m. (g.cap. ⁻¹)	1,17	3,36	1,14	5,67
	rendement en %	4,5	12,9	4,4	21,8
	% A.GA.	65	79	38	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,77	2,65	0,43	3,84
	DM en %	49	39	41	
4	m. (g.cap. ⁻¹)	1,08	4,24	0,71	6,03
	rendement en %	5,1	19,9	3,3	28,3
	% A.GA.	69,0	70,0	65,0	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,74	2,98	0,46	4,18
	DM en %	47	42	34	
5	m. (g.cap. ⁻¹)	1,48	3,83	0,82	6,13
	rendement en %	7,5	19,3	4,1	30,9
	% A.GA.	59,0	73,0	65,0	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,87	2,79	0,53	4,19
	DM en %	50	41	30	
6	m. (g.cap. ⁻¹)	1,48	2,01	0,58	4,07
	rendement en %	9,5	13,0	3,7	26,2
	% A.GA.	54,0	90,0	79,0	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,80	1,80	0,46	3,06
	DM en %	31	21	23	
7	m. (g.cap. ⁻¹)	0,87	2,96	0,1	3,97
	rendement en %	8,1	27,4	1,3	36,8
	% A.GA.	32,0	57,0	46,0	
	m. (g d'A.GA./cap.)	0,28	1,68	0,07	2,03
	DM en %	8	18	25	

Ox : fraction extraite à l'oxalate d'ammonium

Tableau 2 : Quantité de pectines extraites des capitules de l'hybride 3 par le protocole d'extraction fractionnée

L'évolution de la quantité de fraction pectique extraite selon le premier protocole, exprimée en grammes d'AGA par capitule au cours du développement de la plante est sensiblement la même pour les trois hybrides étudiées (figure 1). Elle augmente progressivement puis chute à partir des stades 4 ou 5 lors de l'inclinaison du capitule.

Cette diminution n'apparaît pas de la même façon avec le second protocole d'extraction (figure 2). L'oxalate d'ammonium permet d'extraire une quantité importante de pectines, qui ne sont pas extraites par l'HCl seul à partir du stade 4. Il semble donc qu'un changement de nature des pectines intervienne autour de ce stade. La diminution de la

quantité de pectines qui apparaît aux stades 6-7 avec ce second protocole peut être corrélée avec la baisse de quantité de matière organique dans le capitule en fin de maturation.

Le degré de méthylation des pectines extraites selon le second protocole (figure 3), chute brusquement à partir du stade 5. Les pectines ont subi une déméthylation, leur DM moyen passe d'une valeur comprise entre 40% et 60% à une valeur voisine de 20%. Parallèlement l'activité des pectines-méthyl estérase diminue jusqu'au stade 3, puis augmente : au stade 6 l'activité est multipliée par plus de 2 (figure 4). Cette augmentation coïncide avec la diminution du DM des pectines.

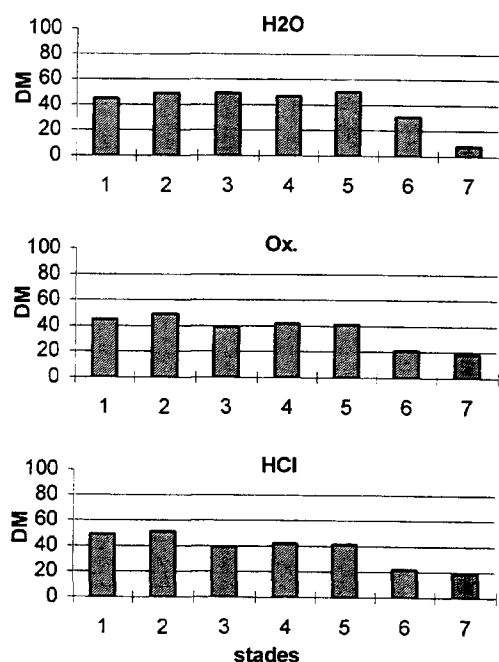


Figure 3 : Comparaison des DM des différentes fractions de pectines extraites de l'hybride 3 selon le protocole d'extraction fractionnée

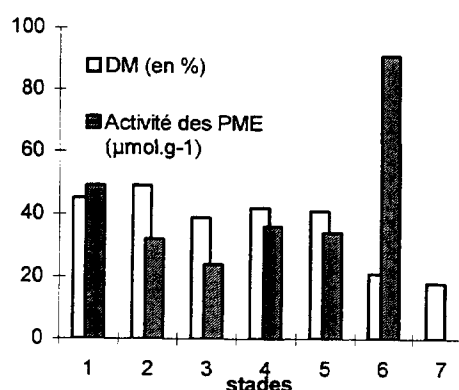


Figure 4 : Evolution comparative du DM des pectines de la fraction extraite à l'oxalate et de l'activité des PME (en μmol de méthanol par gramme de capitules secs)

DISCUSSION

La quantité globale des pectines extraites selon les deux protocoles augmente nettement jusqu'au stade d'inclinaison des capitules. Leur degré de méthylation reste supérieur à 45% aux deux premiers stades. A partir du quatrième stade, l'écart très important entre les fractions extraites selon les deux protocoles indique un changement important dans la structure des pectines. Le faible rendement d'extrait par HCl traduit une diminution de la fraction de pectines à degré de méthylation plus élevé. Simultanément l'activité des PME a augmenté d'une valeur minimale de $24 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à 1,5 fois cette valeur. Par contre la mesure des DM des pectines extraites à l'oxalate d'ammonium traduit une diminution modérée de cette valeur voisine de 40. La détermination du DM par la méthode adoptée conduit en fait à une valeur moyenne sur l'ensemble des fractions pectiques isolées, caractérisées par leur teneur en acide galacturonique. L'évolution du DM, tel que dosé, sera donc la résultante de deux phénomènes : (i) l'évolution de la quantité et de la structure des pectines métabolisées ; (ii) l'évolution de l'activité des PME. Lorsque la quantité des pectines extractibles diminue, aux stades de senescence de la plante, et que l'activité des PME augmente de façon quasi exponentielle, le DM diminue alors très nettement jusqu'à des valeurs inférieures à 20%.

Une telle corrélation entre l'activité des PME se traduisant de façon nette sur le DM des pectines et leur structure, et le stade de maturité d'une plante a aussi été mise en évidence

dans le cas de la tomate (Tieman 1992). La déméthylation des unités d'acide galacturonique fragilise la structure pectique et la rend plus sensible à l'action des polygalacturonases qui s'expriment fortement à la sénescence (Huber 1983, Huber et Lee 1986, Smith 1988, Della Penna 1990). Dans le cas de la tomate, ceci se traduit par un ramollissement des tissus qui conduit à une perte de fermeté de la chair. Dans le cas du tournesol, l'inclinaison du capitule, qui coïncide avec la réaugmentation de l'activité des PME, pourrait être attribuée à la fragilisation de la structure pectique.

Comme l'ont montré Tieman (1992) dans le cas de plantes transgéniques de tomates, intervenir sur les PME par l'introduction d'un gène codant pour l'ARN antisens de cet enzyme, permet de contrôler l'évolution des pectines de la tomate et de leur DM. La mise en œuvre d'une stratégie similaire chez le tournesol pourrait conduire à la production de plantes transgéniques présentant une teneur en pectine plus élevée à maturité. Ces pectines de DM supérieur pourraient alors constituer un bon substrat pour l'industrie et permettre de valoriser le matériel végétal actuellement abandonné après récolte de la graine.

REMERCIEMENT : Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un Bonus Qualité Recherche de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

BIBLIOGRAPHIE

- Bartolome, L.G., Hoff, J.E. 1972. Gas chromatographic methods for the assay of pectin methylesterase, free methanol, and methoxy groups in plant tissues. *J. Agri. Food Chem.* 20 (2) : 262-266.
- Bishop, C.T. 1955. Carbohydrates of sunflower heads. *Can. J. Chem.* 33 : 1521-1529.
- Blumenkrantz, N., Absoe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54 : 484-489.
- Campbell, S. J., Sosulski, F. W., Sabir, M. A. 1978. Development of pectins in sunflower stalks and heads. *Can. J. Plant Sci.* 58 : 863-868.
- Della Penna D. 1990. Polygalacturonase isozymes and pectin depolymerization in transgenic rin tomato fruit. *Plant Physiol.* 94 : 1882-1886.
- Huber, D.J. 1983. Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108 (3) 405-409.
- Huber, D.J., Lee, J. H. 1986. Comparative analysis of pectins from pericarp and locular gel in developing tomato fruit. *Chemistry and function of pectins*. ED. By FISHMAN, M. L. (Washington, G. C., American Chemical Society) : 141-156.
- Kim, W. J., Sosulski, F. W. 1978. Formulation and characteristics of low-ester gels from sunflower heads. *J. of Food Sci.* 43 : 746-749.
- Lin, M.J.Y. , Sosulski, F. W., Humbert, E. S., Downey, R. K. 1975. Distribution and composition of pectins in sunflower plants. *Can. J. Plant Sci.* 55 : 507-513.
- Lin, M.J.Y., Humbert, E. S. , Sosulski, F. W. 1976. Extraction of pectins from sunflower heads. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 9 : 70-74.
- May, C. D. 1990. Industrial pectins : sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* 12 : 79-99.
- Neukom, H. 1967. Pectic substances in *Encyclopedia of Chemical Technology*. 2^e édition, vol. 14, J. WILEY and sons, New-York.
- Pathak, D. K., Shukla, S. D. 1981. Quantity and quality of pectin in sunflower at various stages of maturity. *J. Food Sci. Technol.* 18 : 116-117.
- Riaz, S., Uddin, M. 1972. Polysaccharide components of sunflower heads. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 15 : 167-170.
- Sabir, M. A. , Sosulski, F. W., Campbell, S. J. 1976. Polymetaphosphate and oxalate extraction of sunflower pectins. *J. Agri. Food Chem.* 24 : 348-350.
- Sexton, R., Roberts, J. A. 1982. Cell biology of abscission. *Plant Physiol.* 33 : 133-162.
- Shewfelt, A.L., Worthington, O.J. 1953. The extraction of pectin from sunflower heads. *Food Technol.* 7:336-340.
- Smith, C. J. S. 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334 : 724-726.
- Stoikoff, S. 1948. Uber sonnenblumenpektin. *Mitt. Geb. Lebensm. u. Hyg.* 39 : 292-299.
- Tieman, D. M. 1992. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *The Plant Cell* 4 : 667-679.
- Zitko, V., Bishop, C. T. 1965. Fractionation of pectins from sunflowers, sugar beets, apples and citrus fruits. *Can. J. Chem.* 43 : 3206-3214.