



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Université de Lorraine

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
École Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

THÈSE

Présentée à L'Université de Lorraine

Par

Nadine KARAKI

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**Impact de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine par des
composés phénoliques sur la structure et les propriétés
physicochimiques du polymère**

Soutenue publiquement le 16 Décembre 2015 devant la commission d'examen

Membres du jury

Rapporteur	Pr. Andrée Voilley	Professeur Émérite de l'Université de Dijon
Rapporteur	Pr. Catherine Sarazin	Professeur à l'Université de Picardie
Examineur	Pr. Catherine Viot-Humeau	Professeur à l'Université de Lorraine, Directeur de thèse
Examineur	Dr. Jordane Jasniewski	Maître de conférences à l'Université de Lorraine, Co-directeur de thèse
Invité	Dr. Lionel Muniglia	Maître de conférences à l'Université de Lorraine
Invité	Dr. Abdulhadi Aljawish	Post-Doc à l'Université de Bourgogne - Dijon

Dédicace

Dédicace

A mes très chers parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous ce que vous avez fait pour moi. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi. Je vous dédie ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Remerciements



*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*
Marcel Proust

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes directeurs de thèse, Catherine Humeau-Virot, Jordane Jasniewski et Lionel Muniglia. Votre compétence, votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont beaucoup appris.

J'exprime tous mes remerciements à Pr. Andrée Voilley et Pr. Catherine Sarazin pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit et de participer au jury de ma soutenance.

Je remercie également Abdulhadi Aljawish d'avoir participé à mon comité de thèse et pour ses conseils au cours de ces deux années.

Je voudrais dire un grand merci à tous les membres des équipes LIBio pour leur accueil chaleureux et leur sympathie. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté. Je garde d'excellents souvenirs de nos sorties et des jours passées avec vous.

J'adresse mon affection à mes co-bureaux et à mes ami(e)s pour leur gentillesse et leur humour et à toutes les personnes qui ont cru en moi et m'ont toujours encouragé au cours de ces années. Puisque, ce n'est pas tant l'aide de nos amis qui nous aide que notre confiance dans cette aide.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute ma gratitude à ma famille qui m'a appris que les problèmes pourraient se résoudre si on a la foi et si on est entouré des gens qui croient en nous et nous aime. Merci pour votre soutien et amour inconditionnel.

Table des matières

Liste des figures hors publications.....	IV
Liste des tableaux hors publications.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Liste des publications et communications	IX
Introduction générale.....	1
I. Bibliographie.....	4
I. Laccase : structure, mécanisme d'action et application	4
I.1 Polyphénols oxydases (PPO).....	4
I.2 Histoire des laccases.....	5
I.3 Définition.....	5
I.4 Localisation	5
I.5 Propriétés et fonctions physiologiques.....	6
I.6 Structure	6
I.7 Mécanisme réactionnel.....	8
I.8 Classification selon la spécificité des substrats	12
I.9 Facteurs influençant l'activité des laccases	14
I.10 Produits d'oxydation des laccases	17
I.11 Réactivité des quinones et additions nucléophiles	17
I.12 Applications biotechnologiques des laccases	19
II. Revue de synthèse bibliographique.....	23
II.1 Introduction	23
II.2 Enzymatic modification of polysaccharides: mechanisms, properties, and potential applications. A review.....	24
I. Introduction	25
II. Chitosan.....	27
III. Cellulose.....	40
IV. Pectin.....	47
V. Starch.....	52
VI. Conclusion.....	55

Table des matières

VII. Références	56
III. Assemblage des polysaccharides pour vectoriser un principe actif	73
III.1 Introduction	73
III.2 Définition.....	73
III.3 Histoire de l'encapsulation	73
III.4 Systèmes d'encapsulation.....	73
III.5 La morphologie des particules.....	76
III.6 Facteurs influençant la taille des particules	77
III.7 Formulations des particules.....	78
III.8 Le principe actif : la curcumine.....	79
III.9 Méthode d'encapsulation.....	82
Objectifs du travail.....	89
II. Matériels et Méthodes	92
I. Biocatalyseur et produits chimiques	92
I.1 Produits chimiques	92
II. Oxydation enzymatique des composés phénoliques	94
II.1 Purification partielle de la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	94
II.2 Caractérisation de la laccase purifiée	94
II.3 Oxydation enzymatique de composés phénoliques par la laccase.....	96
II.4 Méthodes analytiques de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse	96
III. Fonctionnalisation enzymatique de la pectine	97
III.1 Greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine.....	97
III.2 Caractérisation structurale des pectines natives et fonctionnalisées.....	99
III.3 Propriétés physicochimiques des pectines natives et fonctionnalisées.....	101
IV. Propriétés thermiques.....	106
V. Propriétés hygroscopiques.....	107
VI. Etude des propriétés rhéologiques.....	109
VI.1 Viscosité	109
VI.2 Gélification.....	109
VII. Propriétés antiradicalaires	110
VII.1 Piégeage des radicaux DPPH'	110

Table des matières

VII.2	Piégeage des radicaux ABTS ^{•+}	111
VIII.	Auto-assemblage et encapsulation	113
VIII.1	Auto-assemblage	113
VIII.2	Encapsulation	115
III.	Résultats et Discussion	118
I.	Chapitre I : Fonctionnalisation de la pectine par des composés phénoliques, catalysée par la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i> en milieu aqueux	118
I.1	Introduction	118
I.2	Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid ...	120
I.3	Contribution de l'article	144
II.	Chapitre II : Influence du greffage de composés phénoliques sur les propriétés de la pectine : caractérisation d'un nouvel ingrédient fonctionnel	146
II.1	Introduction	146
II.2	Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols.....	148
II.3	Contribution de l'article	169
III.	Chapitre III : Fonctionnalisation de la pectine par adsorption de composés phénoliques	171
III.1	Introduction	171
III.2	Caractérisation structurale de la pectine-POX.....	171
III.3	Caractérisation physicochimique de la pectine-POX	176
III.4	Propriétés antiradicalaires de la pectine-POX	186
III.5	Conclusion.....	187
IV.	Chapitre IV : Assemblage des polysaccharides et vectorisation d'un principe actif	188
IV.1	Auto-assemblage de la pectine et du chitosane	188
IV.2	Encapsulation	201
IV.3	Conclusion.....	204
IV.	Conclusion et Perspectives	206
V.	Références bibliographiques	214

Liste des figures hors publications

Figure 1 : Schéma des réactions catalysées par les polyphénol-oxydases (PPO).....	4
Figure 2 : Réactions catalysées par la laccase	5
Figure 3 : (A) Déplacement des électrons dans le site actif de la laccase de <i>Melanocarpus albomyces</i> et (B) représentation de la structure 3D de cette laccase obtenue par cristallographie aux rayons X	7
Figure 4 : Représentation schématisée du site actif de la laccase de <i>Bacillus subtilis</i> comprenant 4 atomes du cuivre.....	8
Figure 5 : Oxydation de l'acide ferulique catalysée par la laccase	9
Figure 6: Formation des dimères homogènes et hétérogènes au cours de l'oxydation de composés phénoliques catalysée par la laccase.....	10
Figure 7 : Oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases	11
Figure 8 : Couplage hétérogène de type C-N pouvant avoir lieu lors de l'oxydation du catéchol catalysée par la laccase, en présence de l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique	12
Figure 9 : Représentation schématisée du cycle redox de la laccase en absence (a) ou en présence d'un médiateur chimique (b)	14
Figure 10 : Réactions entre les quinones et les amines conduisant à des bases de Schiff et des adduits de type michaelien	18
Figure 11 : Microsphère (a) et microcapsule (b)	74
Figure 12 : Représentation des quatre structures des nanoparticules ; nanosphères (NS) (a), nanosphères + principe actif adsorbé (b), nanocapsules (NC) avec un principe actif dissous (c) ou dispersé (d).....	75
Figure 13 : Schéma d'un liposome formé par des phospholipides en une solution aqueuse	76
Figure 14: La morphologie de différentes particules: sphères (beads), sphères creuses (hollow beads), particules en forme de lentilles (lens shape particles), sphères revêtues (coated beads) et (particules à plusieurs compartiments (multicompartment beads).....	77
Figure 15: Photo de <i>Curcuma longa</i> (à gauche), la plante d'où est extrait le curcuma, de sa racine et de l'épice (à droite).....	79
Figure 16 : Structure de la curcumine	80
Figure 17: Dégradation de la curcumine en milieu alcalin.....	81
Figure 18 : Schéma de la gélification thermique	83
Figure 19 : Schéma du spray-drying	84
Figure 20 : Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt du coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu (d), solidification de l'enveloppe (e)	85
Figure 21 : Le potentiel zêta représente la charge d'une particule au niveau du plan de cisaillement	103
Figure 22: Exemple de thermogramme obtenu par DSC	107
Figure 23: Représentation du complexe « polyélectrolyte » entre la pectine et le chitosane.....	113

Liste des figures hors publications

Figure 24: Protocole de l'encapsulation de la curcumine dans un mélange de polyélectrolytes composé de pectine et de chitosane	117
Figure 25 : Spectres UV/ visible de la pectine native (bleu ■), la pectine-F (orange ●) et la pectine-POX (vert ▲) à 1 g/l dans l'eau distillée	172
Figure 26: Spectre FTIR de la pectine native (bleu), la pectine-F (orange) et la pectine-POX (vert). 173	
Figure 27 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage des pectines native et modifiées (pectine-F et pectine-POX), agrandissement à 2 µm	175
Figure 28 : Corrélation de l'intensité de couleur de la pectine native et des pectines modifiées à leur teneur en phénols.....	177
Figure 29 : Isothermes de sorption obtenues pour la pectine native (bleu), la pectine-F (orange) et la pectine-POX (vert), à 25 °C	179
Figure 30 : Résidu obtenu à l'issu de la dégradation thermique de la pectine.....	182
Figure 31 : Variation de la viscosité de solutions de pectine native (bleu), pectine-F (orange) et pectine-POX (vert) en fonction de la vitesse de cisaillement. La viscosité est mesurée à 25 ± 1 °C avec une géométrie cône-plan (50 mm, 2 °).....	183
Figure 32 : Variation de la viscosité en fonction de la concentration en pectine native (bleu), pectine-F (orange) et pectine-POX (vert). Les viscosités ont été mesurées à 25 ± 1 °C et une vitesse de rotation fixe de cisaillement de 2,78.10 ⁻⁴ s ⁻¹	184
Figure 33 : Variation de la fréquence (Hz) en fonction du module élastique G' (●) et visqueux G'' (■) (Pa) de la pectine-POX.....	185
Figure 34 : Variation du module G' de la pectine-POX (1.25% m/v) en fonction du temps.	186
Figure 35 : Variation de la distribution de taille des microparticules de pectine native /chitosane natif. D ₁₀ en bleu, D ₅₀ en rouge, D ₉₀ en vert et le span en jaune, en fonction de la température	193
Figure 36 : Variation de la taille moyenne (D ₅₀) des microparticules pectine native / chitosane natif en fonction de la vitesse d'agitation (rpm). La valeur de span obtenue pour chaque condition est notée au-dessus de chaque point	194
Figure 37 : Variation de la distribution de taille des microparticules de pectine native/chitosane natif en fonction du ratio entre les polysaccharides. Déviation standard < 5 %.....	198
Figure 38 : Distribution de taille des microparticules de pectine native:chitosane natif (bleu), de pectine native:chitosane fonctionnalisé (vert), de pectine fonctionnalisée:chitosane natif (orange) et de pectine fonctionnalisée:chitosane fonctionnalisé (jaune) à 0,05 %, dans le milieu réactionnel à pH 4,5 et à 25 °C	199

Liste des tableaux hors publications

Tableau 1: Les applications de l'encapsulation dans le domaine pharmaceutique et médicale	88
Tableau 2 : Solvants utilisés	92
Tableau 3 : Produits chimiques utilisés	93
Tableau 4 : Substrats phénoliques utilisés.....	93
Tableau 5 : Gradient d'élution pour le dosage de l'acide férulique par CLHP.....	97
Tableau 6 : Résumé des conditions fixes et variables utilisées dans la préparation des microparticules de pectine native/chitosane natif	115
Tableau 7: Les volumes des biopolymères utilisés dans la préparation des assemblages pectine : chitosane.....	116
Tableau 8 : Détermination de la teneur en phénol dans la pectine native et ses dérivées	176
Tableau 9 : Températures de transition thermiques de la pectine native et des pectines modifiées....	180
Tableau 10: Activité antioxydante de la pectine native et des pectines -POX et -F, exprimée en valeurs EC50.....	187
Tableau 11 : La mobilité électrophorétique de la pectine (0.15 % m/v) et du chitosane (0.15 % m/v) natif (symbolisé par N) et fonctionnalisé (symbolisé par F) à un pH de 4,5	189
Tableau 12 : Distribution granulométrique de la pectine et du chitosane sous forme native (N) et fonctionnalisée (F) à une concentration de 0,15 % et un pH de 4,5	190
Tableau 13 : Variation de la taille des microparticules de pectine native-chitosane natif en fonction de la concentration en acide acétique.....	192
Tableau 14 : Variation de la taille des microparticules pectine native/chitosane natif (ratio 1:1) en fonction du temps réactionnel	196
Tableau 15 : Variation de la distribution de taille des microparticules de pectine native/chitosane natif en fonction de la concentration de polysaccharides	197
Tableau 16 : Variation des paramètres de taille (D_{10} , D_{50} et D_{90}) en fonction du ratio volumique de pectine native : chitosane native.....	199
Tableau 17 : Distribution de taille des microparticules en fonction des assemblages de pectine:chitosane formés.....	200
Tableau 18 : Les ratios volumique pectine : chitosane des quatre assemblages préparés à partir des polymères natifs et fonctionnalisés et leur potentiel Zeta	201
Tableau 19 : Pourcentage de la curcumine piégée dans les quatre types de microparticules.....	202
Tableau 20 : Pourcentage de la curcumine piégée dans les quatre types de microparticules.....	204

Liste des abréviations

ABC : Acide bicinchoninique

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate

AF : Acide férulique

Aw : activité de l'eau

BPA : Bisphénol A

BPS : Tampon phosphate

CIE : Commission International de l'Eclairage

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CL-SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Cu : Cuivre

DE : Degré d'estérification

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-diphényl -2-picril hydrazil

DPQ : 3,3',5,5'-tetraméthyldiphénoxyquinone

DSC : Dynamic Scanning Calorimetry

DVS : Sorption Dynamique de Vapeur

E° : Potentiel redox

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

ESI : Ionisation par électrospray

FT-IR : Infra-rouge à transformée de Fourier

HCOOH : Acide méthanoïque

HM : Fortement méthylé (High methoxy)

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IC₅₀ et **EC₅₀** : Concentration inhibitrice

LM : Faiblement méthylé (Low methoxy)

MEB ou **SEM**: Microscopie électronique à balayage

MM : Masse molaire

NC : Nanocapsules

NS : Nanosphères

Pectine F : Pectine modifiée par fonctionnalisation enzymatique directe de la pectine

Pectine N : Pectine native (non modifiée)

Liste des abréviations

Pectine POX : Pectine modifiée par adsorption des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine

pKa : constante d'acidité

POD : Peroxydases

POX : Produits d'oxydation de l'acide férulique

PPO : Polyphénoloxydases

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPE : Résonance paramagnétique électronique

TEMPO : 2,2,6,6-tétra méthyl pipéridine-1-oxyl

TFA : Acide trifluoroacétique

UI : Unité enzymatique

Liste des publications et communications

Communications orale et par affiche

- ❖ **Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., Jasniewski, J.,** Novel phenolic derivatives of pectin: enzymatic synthesis and properties (2015), Biopolymers and bioplastics conference, San Francisco-USA.
- ❖ **Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., Jasniewski, J.,** Fonctionnalisation enzymatique de la pectine : Une approche « green chemistry » (2015), Ressources énergétiques souterraines ... quoi de neuf ? séminaire, Nancy-France.

Publications

- ❖ **Nadine Karaki, Abdulhadi Aljawish, Catherine Humeau, Lionel Muniglia, and Jordane Jasniewski*** (2015). Enzymatic modification of polysaccharides: mechanisms, properties, and potential applications. A review. “ *Enzyme and microbial technology journal*”, accepté avec modifications.
- ❖ **Nadine Karaki, Abdulhadi Aljawish, Lionel Muniglia, Sabine Bouguet-Bonnet, Sebastien Leclerc, Jordane Jasniewski and Catherine Humeau*** (2015). Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid. Article soumis au “*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*”
- ❖ **Nadine Karaki, Abdulhadi Aljawish, Catherine Humeau, Lionel Muniglia, and Jordane Jasniewski*** (2015). Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols. Article soumis au journal “*Food hydrocolloids*”

Introduction générale

Introduction générale

Soucieuse de sécurité et de santé, la société a de plus en plus tendance à rejeter les produits comprenant des composés de synthèse. Depuis plus d'une décennie, les industriels se tournent vers l'utilisation de molécules naturelles et de leurs dérivés pour mieux valoriser les ressources renouvelables, éventuellement transformées par des procédés que l'on souhaite plus respectueux de l'environnement.

Dans ce contexte, certains procédés chimiques ont été remplacés par des procédés de chimie verte qui permettent de réduire l'impact environnemental des activités industrielles. Afin de réduire la pollution des sols, de l'eau et de l'air, l'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions apparaît comme une alternative intéressante aux procédés chimiques classiques et constitue une voie pertinente pour la production de nouvelles molécules et/ou apporter de nouvelles fonctionnalités à des molécules naturelles d'intérêt. Industriellement, cette démarche caractérise le domaine des biotechnologies blanches.

Les enzymes sont des catalyseurs biodégradables et non-toxiques produits naturellement par des microorganismes ou par expression hétérologue. Elles sont capables de catalyser des réactions ciblées, grâce à leur spécificité, dans des conditions expérimentales douces. Ainsi les enzymes sont souvent chimiosélectives, régiosélectives et / ou énantiospécifiques. Elles permettent donc la synthèse de produits présentant des structures bien définies ou stéréospécifiques (Cunha & Gandini, 2010; Q. M. Gu & Cheng, 2005a).

Parmi les enzymes connues à ce jour, les oxydoréductases ont démontré leur potentiel pour catalyser l'oxydation de composés phénoliques et la production de molécules bioactives aux propriétés colorantes (Mustafa *et al.*, 2005) ou antioxydantes (Aljawish *et al.*, 2012a; Božič, Gorgieva, & Kokol, 2012; Ren, Li, Dong, Feng, & Guo, 2013). Plusieurs études ont été menées au cours des années passées pour réticuler la pectine par oxydation de l'acide férulique, naturellement présent dans la structure du polysaccharide (Abang & Meyer Anne, 2013; Zaidel,

Chronakis, & Meyer, 2012). D'autres travaux ont été menés sur le greffage de composés phénoliques exogènes sur le chitosane (Aljawish, Chevalot, Jasniewski, Scher, & Muniglia, 2014; Pasanphan, Buettner, & Chirachanchai, 2010; Ren et al., 2013), et la cellulose (Cusola, Valls, Vidal, & Roncero, 2013; Elegir, Kindl, Sadocco, & Orlandi, 2008; Kim, Zille, Murkovic, Guebitz, & Cavaco-Paulo, 2007; Rencoret et al., 2014). Ces biopolymères sont connus pour leurs nombreux avantages tels que l'absence de toxicité, la biodégradabilité dans l'écosystème, et la disponibilité à partir de ressources peu coûteuses et renouvelables (Reddy, Mohan, Satla, & Gaikwad, 2011; Tizzotti, Charlot, Fleury, Stenzel, & Bernard, 2010).

Des travaux antérieurs ont été réalisés au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) par Aljawish en 2014. Un procédé de greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle sur le chitosane a été développé, permettant d'obtenir de nouvelles formes de chitosane fonctionnalisés, présentant des propriétés améliorées par rapport au polysaccharide natif (antioxydantes, antibactériennes et de cytotoxicité). L'objectif principal de ce travail de thèse est d'étendre cette approche à un autre polysaccharide d'intérêt, la pectine. Ainsi, le but sera de greffer les produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine, en utilisant le potentiel catalytique de la laccase de *Myceliophthora thermophila* et de répondre à une suite de questions scientifiques concernant :

- La faisabilité d'un greffage covalent des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine
- La faisabilité d'une fonctionnalisation de la pectine par adsorption de composés phénoliques
- L'impact de l'approche de fonctionnalisation utilisée sur la structure et les propriétés techno-fonctionnelles (antiradicalaires, hygroscopie, thermiques...) et biologiques du biopolymère.
- L'existence de relations structure-propriétés pour la pectine et ses dérivés

Introduction générale

- La possibilité de combiner les propriétés fonctionnelles de la pectine telles que son action texturante et gélifiante, avec les propriétés biologiques de l'acide férulique, au sein d'un nouveau copolymère utilisable dans des applications traditionnelles ou plus innovantes.

Enfin, une partie du travail a été dédiée à l'étude des propriétés d'encapsulation de systèmes associant la pectine ou ses dérivés avec un polymère cationique : le chitosane.

Bibliographie

Laccase : structure, mécanisme d'action et application

I. Bibliographie

I. Laccase : structure, mécanisme d'action et application

I.1 Polyphénols oxydases (PPO)

Les principales enzymes oxydatives connues sont les polyphénols-oxydases (PPO) (EC 1.10.3.1) qui utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat, et les peroxydases (POD) (EC 1.11.1.7) qui utilisent le peroxyde d'hydrogène. Les polyphénols-oxydases (PPO) sont des métalloprotéines qui contiennent du cuivre dans leur site actif. Elles peuvent catalyser l'oxydation des composés phénoliques avec réduction de l'oxygène dans l'eau (Xu, 2001). Les PPO peuvent être divisées en monophénol-oxydases ou crésolase (EC1.14.18.1) conduisant à l'hydroxylation en *ortho* d'un substrat monophénolique (Figure 1) et en diphénol-oxydases catalysant l'oxydation d'un diphénol en benzoquinone. La classe diphénoloxydase est divisée, selon la classification internationale, en deux sous-groupes : les catécholoxydases (CO) (EC1.10.3.1) et les laccases (oxygène oxydoréductase : EC 1.10.3.2).

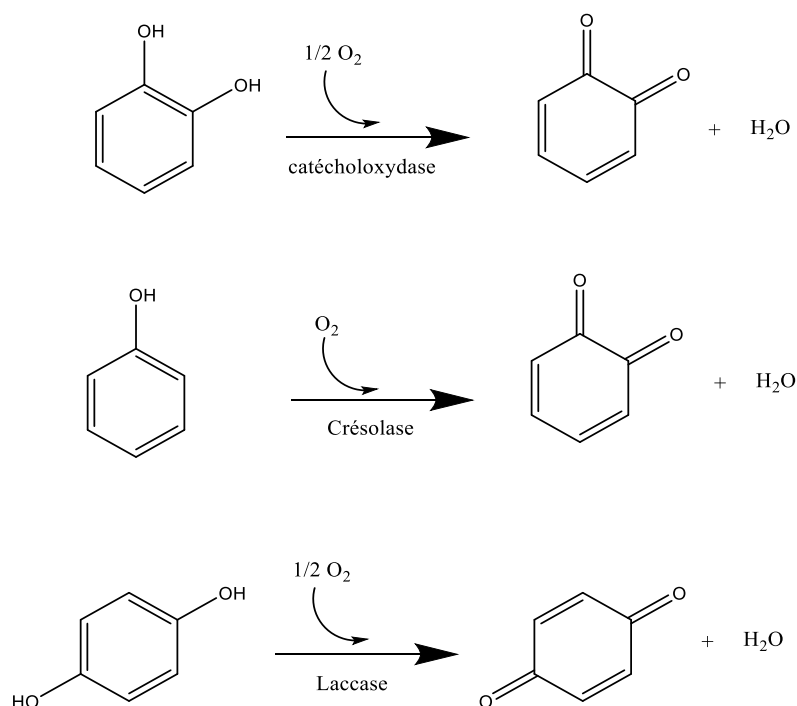


Figure 1 : Schéma des réactions catalysées par les polyphénol-oxydases (PPO) (modifié de Maghsoudi et al., 2013)

I.2 Histoire des laccases

Historiquement, les laccases ont été découvertes par Yoshida en 1883, en constatant le rapide durcissement, en présence d'air, du latex produit par les arbres appelés « vernis du Japon » (*Rhus verniciflua*) (Gianfreda, Xu, & Bollag, 1999). Cependant, en 1896, Bertrand et Laborde ont démontré que les laccases sont aussi des enzymes fongiques (Thurston, 1994). Depuis, de nombreuses études ont porté sur l'origine et l'action des laccases.

I.3 Définition

Les laccases sont des enzymes contenant du cuivre qui catalysent l'oxydation d'une grande variété de substrats organiques et inorganiques, y compris les mono-, les di- et polyphénols, les acides phénoliques, les méthoxyphénols, les amines aromatiques et les monomères de lignine. Les différentes réactions catalysées par les laccases sont résumées sur la Figure 2.

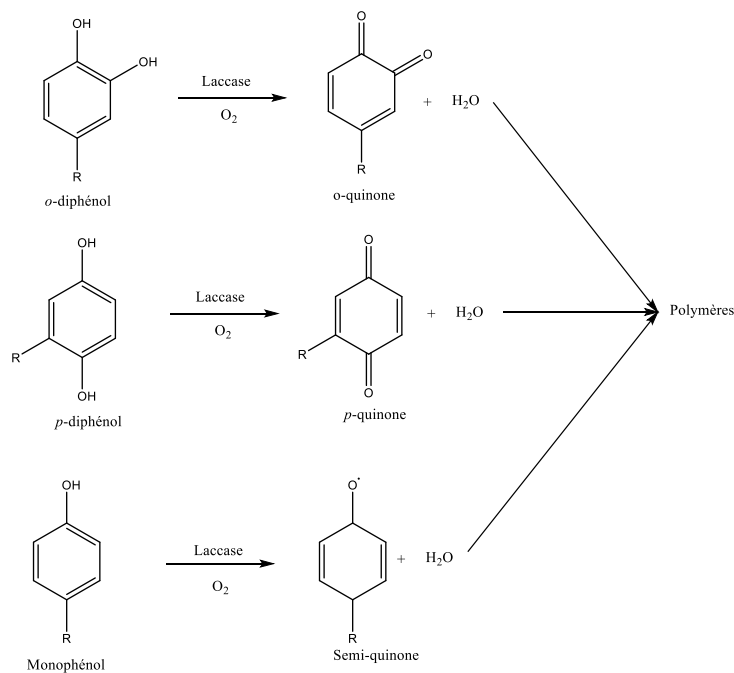


Figure 2 : Réactions catalysées par la laccase (Aljawish, Chevalot, Jasniewski, Scher, & Muniglia, 2015)

I.4 Localisation

Les laccases sont abondantes dans la nature. Elles sont classées en fonction de leur origine. La plupart des laccases étudiées sont des protéines extracellulaires, bien que des

laccases intracellulaires aient été détectées dans la plupart des champignons et des insectes comme *Drosophila melanogaster* (Claus, 2004). L'extraction des laccases est compliquée parce qu'elles sont fortement liées à la paroi cellulaire. La caractérisation de l'activité laccasique est délicate dans les extraits bruts en raison de la présence fréquente d'autres activités oxydasiques dues à des enzymes comme la catécholoxydase et la peroxydase (Mayer & Staples, 2002).

I.5 Propriétés et fonctions physiologiques

Les laccases sont des glycoprotéines ayant un poids moléculaire variant de 50 à 100 kDa. Le pH optimal des laccases fongiques varie de 3 à 8. Par exemple, la laccase de *Myceliophthora thermophila* présente une activité optimale à pH 7,5 (Mustafa, Muniglia, Rovel, & Girardin, 2005). Les laccases issues des plantes ont un point isoélectrique pouvant aller jusqu'à 9. Le taux d'oses dans les laccases varie de 10 à 45 % selon l'espèce ou le ligand sachant que cette glycosylation contribue à une plus grande stabilité de l'enzyme (Durán, Rosa, D'Annibale, & Gianfreda, 2002).

Des études sur le fonctionnement physiologique des laccases ont montré que les laccases des plantes sont impliquées dans la synthèse de la lignine (composé structural de la membrane cellulaire des plantes). Par contre, les laccases produites par des champignons (ex. *Basidiomycete*) sont impliquées dans la dégradation de la lignine, la pigmentation (biosynthèse de mélanine), et la morphogénèse (Baldrian, 2006).

I.6 Structure

La détermination de la structure des laccases se fait classiquement par cristallographie aux rayons X, par spectroscopie UV / visible ou RPE (résonance paramagnétique électronique). La première structure cristalline d'une laccase isolée à partir de *Coprinus cinereus* a été résolue en 1998, En 2002, la structure des laccases de *Melanocarpus albomyces* et *Trametes versicolor*, ont été résolues (Figure 3). L'année suivante, la structure cristalline du gène de la laccase Cot A bactérienne de *Bacillus subtilis* a été déterminée. Depuis, de nombreuses structures de

laccase, des structures complexes avec des substrats, des inhibiteurs et des produits d'oxydation ainsi que des structures mutantes ont été déterminées par diffraction aux rayons X. Actuellement, il existe 90 structures impliquant des laccases, disponibles dans la banque de données des protéines (PDB) (Hakulinen & Rouvinen, 2015).

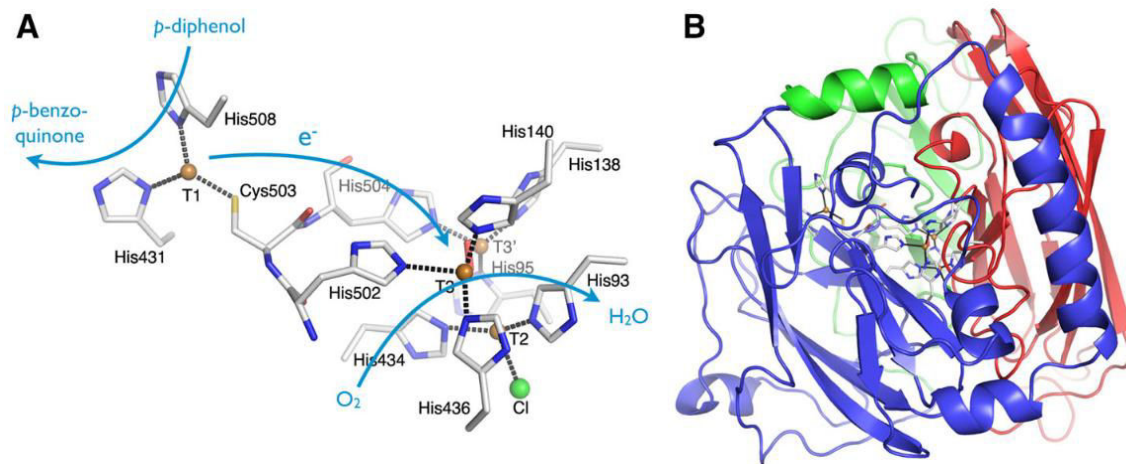


Figure 3 : (A) Déplacement des électrons dans le site actif de la laccase de *Melanocarpus albomyces* et (B) représentation de la structure 3D de cette laccase obtenue par cristallographie aux rayons X (Hakulinen & Rouvinen, 2015)

Les laccases appartiennent à la famille des « multi-copper oxidase » et la superfamille de la cuprédoxine. Sous forme d'holoenzyme active, les laccases sont des dimères ou tétramères de glycoprotéines, contenant généralement dans leur site actif 4 atomes de cuivre, par unité protéique active (Hoegger, Kilaru, James, Thacker, & Kües, 2006). Le site actif des laccases est bien conservé ; il contient plusieurs sites de fixation d'atomes de cuivre de différents types : type 1 (T1, un atome Cu), type 2 (T2, un atome Cu) et type 3 (T3, 2 atomes Cu) (Figure 4) (Witayakran & Ragauskas, 2009).

-Le site T1 absorbe à 610 nm donnant sa couleur bleue à l'enzyme. Cet atome de cuivre est relié à une cystéine.

-Le site T2 (Cu2) n'absorbe pas dans le visible. Il forme un complexe tétraédrique avec l'oxygène et l'atome d'azote de résidus histidine.

-Le site T3, dans lequel chaque ion de cuivre est lié à trois résidus histidine, absorbe à 330 nm. Le cuivre de type 2 forme avec les ions cuivre de type 3 un « cluster » trinucéaire, impliqué dans le mécanisme catalytique de l'enzyme (Kunamneni, Plou, Ballesteros, & Alcalde, 2008). A noter qu'un groupe de 3 atomes de cuivre (Cu2 de T2 et Cu3a et Cu3b de T3) est responsable de l'activation de l'oxygène, alors qu'un seul atome de cuivre (Cu1 de T1) est responsable de l'oxydation des phénols (Claus, 2004).

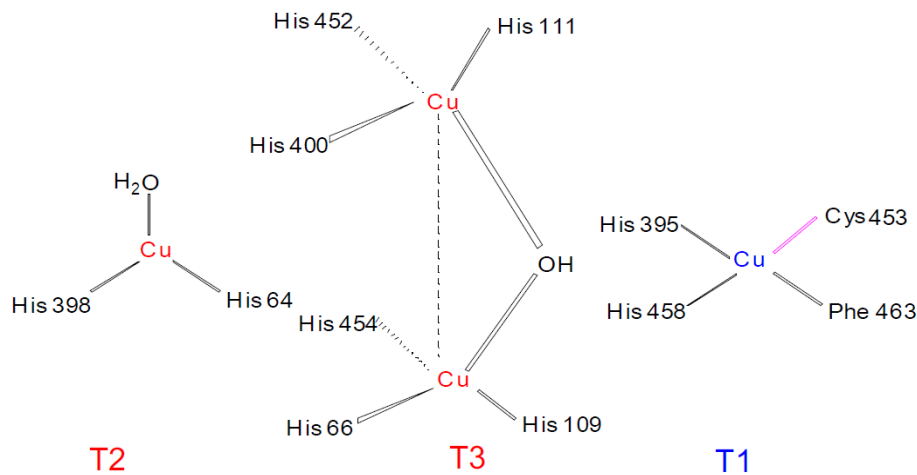


Figure 4 : Représentation schématique du site actif de la laccase de *Bacillus subtilis* comprenant 4 atomes du cuivre (Witayakran & Ragauskas, 2009)

I.7 Mécanisme réactionnel

De nombreuses études ont montré le rôle essentiel du cuivre dans le mécanisme catalytique des laccases. Ce mécanisme est de type « donneur-accepteur » ; il comprend 3 étapes majeures (Figure 5) (Wong, 2009) :

- La première étape est l'oxydation du substrat et la réduction du cuivre Cu1 (Cu^{2+} en Cu^+). Le substrat perd un électron (donneur) et l'atome de cuivre du site T1 gagne un électron (accepteur).
- Au cours de la deuxième étape, les électrons extraits du substrat réducteur sont transférés vers le site T2 / T3 tri-nucléaire. L'atome Cu1 du site T1 est oxydé (Cu^{+1} en Cu^{+2}) et les atomes Cu2, Cu3a et Cu3b des sites T2 et T3 sont réduits (Cu^{+2} à Cu^{+1}).

- Après la réduction complète du centre tri-nucléaire, les atomes de cuivre Cu2 et Cu3a et Cu3b réduisent l'oxygène moléculaire en eau. Les atomes de cuivre agissent donc en donneurs d'électrons (Cu^{+1} en Cu^{+2}) vis-à-vis de l'oxygène moléculaire qui constitue l'accepteur (Figure 5).

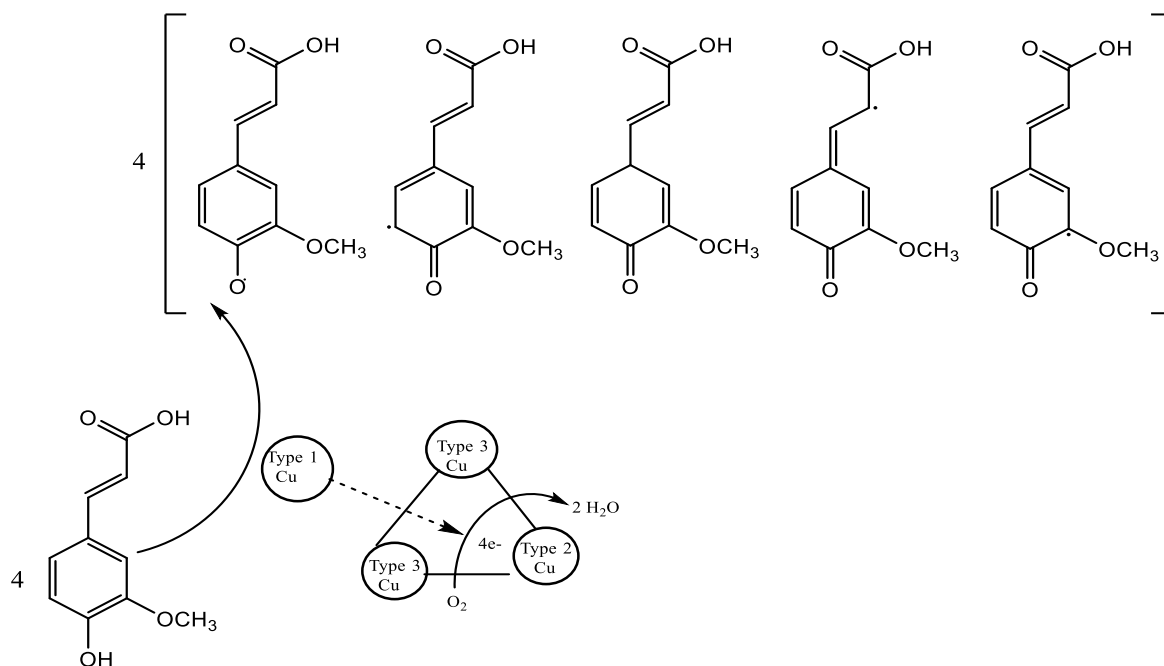


Figure 5 : Oxydation de l'acide ferulique catalysée par la laccase (Kudanga, Nyanhongo, Guebitz, & Burton, 2011)

Dans le cas des substrats phénoliques, les laccases catalysent l'oxydation de ces substrats en radicaux phénoxy « semiquinones » par interaction directe avec le réseau d'atomes de cuivre et réduction concomitante d'une molécule d'oxygène (Galhaup & Haltrich, 2001).

Cette réaction génère des radicaux instables et très réactifs qui peuvent se réorganiser spontanément, par délocalisation des électrons. Ils peuvent conduire soit à des quinones s'ils subissent un deuxième arrachement d'électrons, soit à des dimères puis des oligomères ou des polymères générés par combinaison des dimères formés, s'ils subissent des réactions de couplage non enzymatique (Kunamneni et al., 2008).

Deux types de couplage peuvent avoir lieu au cours de l'oxydation catalysée par les laccases : le couplage homogène qui conduit à de nouvelles molécules homogènes et le couplage hétérogène (Figure 6).

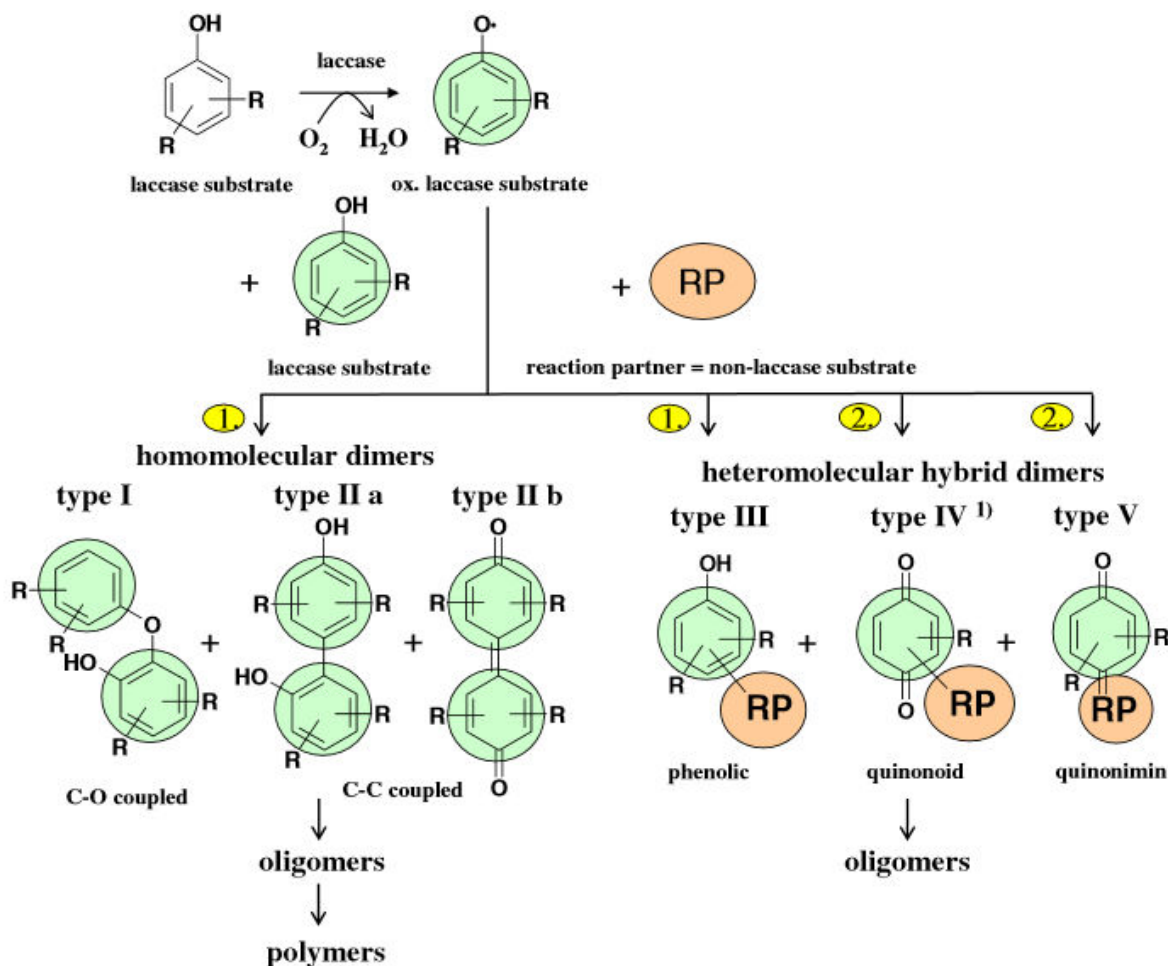


Figure 6: Formation des dimères homogènes et hétérogènes au cours de l'oxydation de composés phénoliques catalysée par la laccase

R : plusieurs substituants ou systèmes cycliques. 1 : Type de réaction = couplage oxydatif C-O (type I de dimères), condensation oxydative C-C (type II a de dimères) ou par couplage oxydatif phénolique C-C (type II b). 2 : Type de réaction : couplage oxydatif avec une amination du noyau au cas où le substrat a une fonction amine libre. Le type III est obtenu par un couplage oxydatif de type C-S et le type IV est obtenu par un couplage oxydatif de type C-O ou C-N (Mikolasch & Schauer, 2009)

Le couplage homogène consiste en une dimérisation des radicaux phénoxyl, formés durant l'oxydation d'un substrat unique par la laccase, aboutissant à des dimères homogènes. Ces

derniers résultent de la formation de nouvelles liaisons entre 2 atomes de carbone (C-C) ou entre un atome de carbone et un atome d'oxygène (C-O) (Polak & Jarosz-Wilkolazka, 2012).

Le couplage C-C est favorisé en milieu acide et à haute température alors que le couplage C-O est favorisé en milieu basique. Par exemple, l'oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases conduit à la polymérisation de ce phénol, générant soit du poly (2,6-diméthyl-1,4-phénylène oxyde) (P-2,6-Me₂P), soit du 3,3',5,5'-tetraméthyldiphénoxyquinone (DPQ) (Kobayashi & Higashimura, 2003), selon les conditions réactionnelles. Dans ce cas, le couplage C-O est favorisé à pH élevé (Figure 7).

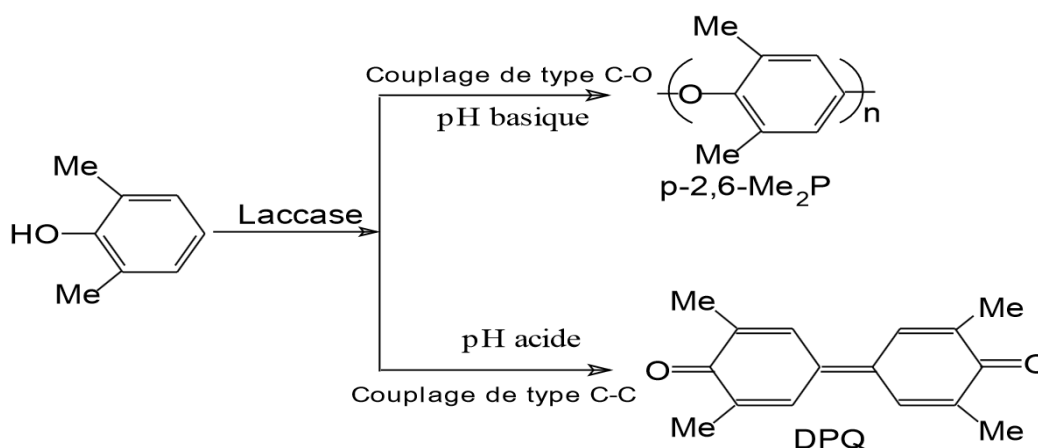


Figure 7 : Oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases (d'après Kobayashi & Higashimura, 2003)

Un autre exemple concerne l'oxydation de l'acide férulique (AF) catalysée par la laccase, conduisant à des dimères *via* des couplages de type C-O. Cependant, un couplage C-C a été observé entre deux radicaux phénoxy de l'AF, en milieu acide et à température élevée (Mustafa et al., 2005).

Le couplage hétérogène consiste en une réaction entre une molécule acceptrice et un radical généré par la laccase. Ceci aboutit à la formation de nouveaux dimères hétérogènes comportant des liaisons de type C-C, C-O, C-N et C-S, dans une étape non-enzymatique (Mikolasch & Schauer, 2009). Un exemple de couplage hétérogène par liaison C-N, est la réaction entre le catéchol (modificateur de couleur) et l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique pour obtenir un

produit coloré. La laccase catalyse la conversion du catéchol en quinone. Très réactive, cette dernière est engagée dans des couplages homogènes *via* des liaisons C-O-C et dans des couplages hétérogènes *via* des liaisons C-N avec l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique (Calafell et al., 2007) (Figure 8).

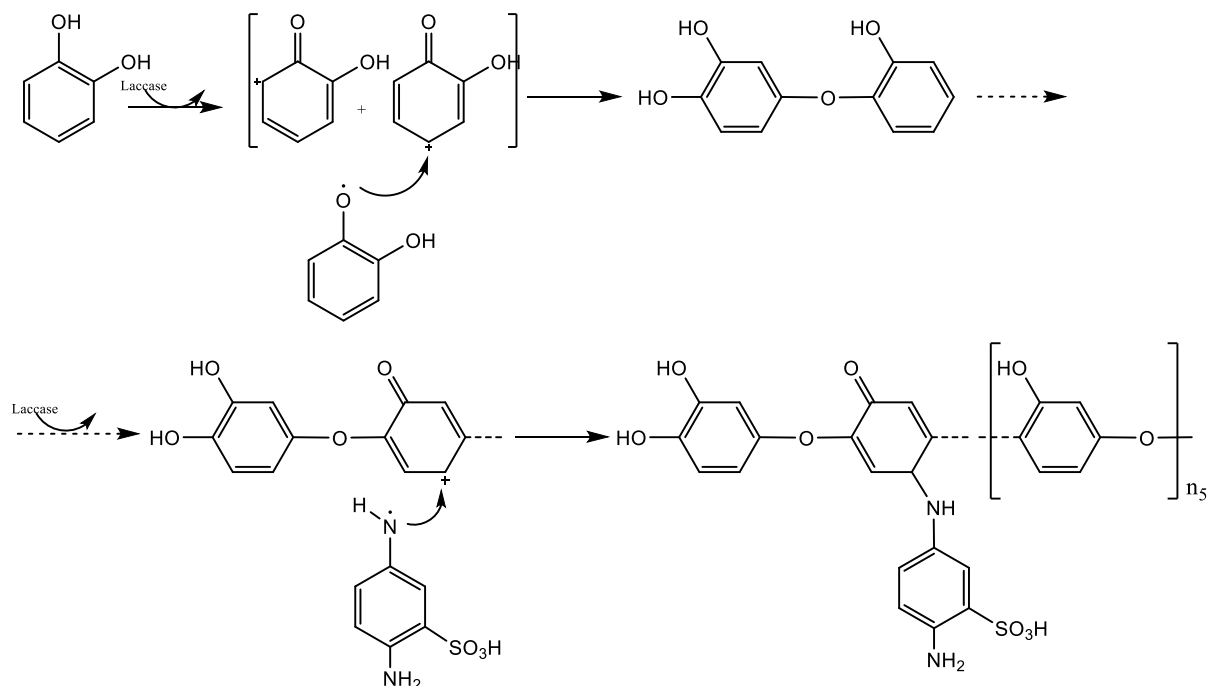


Figure 8 : Couplage hétérogène de type C-N pouvant avoir lieu lors de l'oxydation du catéchol catalysée par la laccase, en présence de l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique (modifié de Fu, Nyanhongo, Gübitz, Cavaco-Paulo, & Kim, 2012)

I.8 Classification selon la spécificité des substrats

I.8.1 Oxydation directe - substrats phénoliques

Les laccases sont capables d'oxyder divers substrats tels les polyphénols, les méthoxyphénols, les diamines (Polak & Jarosz-Wilkolazka, 2012). Elles sont capables d'oxyder directement les composés phénoliques comportant un motif *ortho*- ou *para*-diphénol, avec toutefois une plus grande affinité envers les *para*-diphénols. Parmi les PPO, les laccases sont les seules enzymes capables d'oxyder la syringaldazine (N,N'-bis 3,5 dimethoxy-4 hydroxybenzylidène hydrazine).

L'activité des laccases envers les substrats phénoliques dépend de l'origine de l'enzyme et de la position des substituants par rapport à la fonction phénol (effets électroniques). Généralement, l'efficacité catalytique (V_{max}/K_m) de l'enzyme augmente lorsqu'un substituant du cycle aromatique cède facilement un électron, comme c'est le cas pour les groupements -OCH₃ et -CH₃ (Dec, Haider, & Bollag, 2003). Par contre, les phénols substitués en *ortho* ou *para* par des groupements attracteurs d'électrons tels que les fonctions -NO₂ et -COCH₃ sont plus difficiles à oxyder.

La classification des laccases selon leur spécificité de substrats est difficile car celle-ci varie d'un organisme à l'autre et dépend du potentiel redox de l'enzyme et des substrats. La laccase de *Neurospora crassa* peut oxyder seulement les *ortho*- et *para*-diphénols, à l'exception du phloroglucinol. Les laccases de *Cerrena unicolor* et *Trametes versicolor*, quant à elles, peuvent oxyder les *méta*-diphénols. Par ailleurs, des travaux ont montré une préférence vis-à-vis des *para*-diphénols pour la laccase de *Cerrena unicolor* et une préférence pour les *ortho*-diphénols pour la laccase de *Trametes versicolor* (Madhavi & Lele, 2009).

1.8.2 Oxydation indirecte - substrats non phénoliques

Souvent, les substrats d'intérêt ne peuvent pas être oxydés directement par les laccases, soit parce qu'ils ne peuvent pas accéder au site actif de l'enzyme (encombrement stérique), soit parce qu'ils ont un potentiel redox trop élevé. En imitant la nature, il est possible de surmonter cette limitation grâce à l'ajout de médiateurs chimiques tels que le 2,2,6,6-tétra méthyl pipéridine-1-oxyl (TEMPO) ou l'acide 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS). Ces composés agissent comme des substrats réducteurs intermédiaires pour la laccase. Leur forme radicalaire oxydée, générée par la laccase, interagit à son tour avec le substrat volumineux ou possédant un potentiel redox élevé (Figure 9) (Kudanga et al., 2011). Par ce processus indirect, la lignine peut être dégradée par voie oxydative, en présence d'une laccase et de l'ABTS (Madhavi & Lele, 2009).

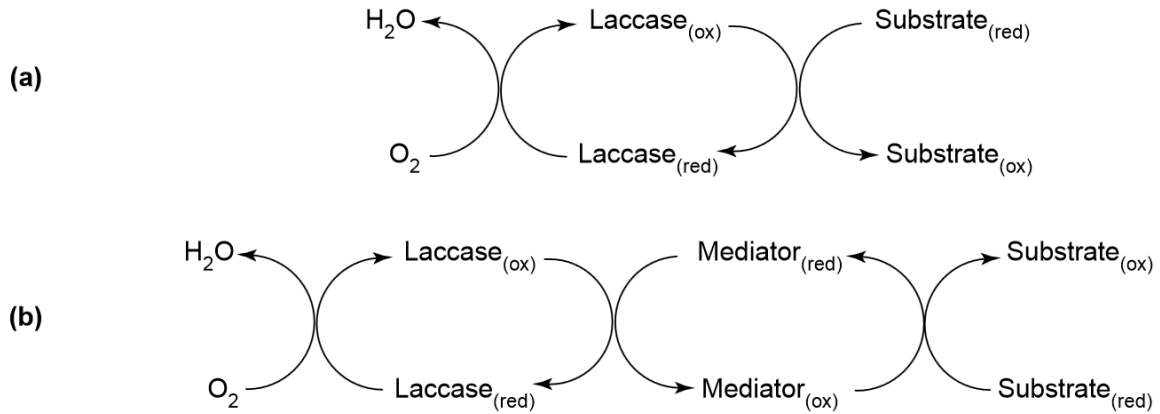


Figure 9 : Représentation schématique du cycle redox de la laccase en absence (a) ou en présence d'un médiateur chimique (b) (Riva, 2006)

I.9 Facteurs influençant l'activité des laccases

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques spécifiques dont l'activité optimale varie selon plusieurs paramètres tels que le pH, la température, les concentrations en substrats, les inhibiteurs, les inducteurs, la composition du milieu...

I.9.1 Influence du milieu réactionnel

Les réactions catalysées par des laccases en milieu aqueux sont limitées en raison de la forte réactivité des intermédiaires générés (quinones, semi-quinones). Ceux-ci polymérisent rapidement et spontanément, conduisant à la formation de polymères insolubles et à l'apparition d'agrégats. Le rendement de conversion des phénols chute alors fortement en raison de l'inactivation de l'enzyme (par les produits de la réaction) et de son incapacité à diffuser dans le milieu (Colombo & Carrea, 2002). L'effet du solvant dans une réaction enzymatique a été largement démontré. En effet, celui-ci interagit directement avec l'enzyme ; il influence par ailleurs la solvation des substrats et des produits dans le milieu réactionnel. Un solvant organique peut dénaturer l'enzyme en modifiant la structure tridimensionnelle de la protéine entraînant ainsi une perte de l'activité catalytique. Au contraire, l'eau participe au maintien de la structure protéique et de l'activité enzymatique associée (Guoning Fan, 2006; Vachoud, Chen, Payne, & Vazquez-Duhalt, 2001a). D'autre part, en milieu organique, le solvant permet d'augmenter la solubilité des substrats et des produits. Il permet également une meilleure

dissociation des complexes enzyme / produits grâce à l'insolubilité des enzymes en phase organique et à la solubilité dans la phase organique des produits de la réaction. Ceci se traduit par une faible inhibition de l'enzyme par les produits et par une faible diffusion des ces derniers au niveau du site actif. Compte tenu de ces observations, les milieux combinant une phase aqueuse et un solvant organique miscible apparaissent comme des milieux intéressants pour mener des réactions enzymatiques impliquant des substrats ou des produits insolubles dans l'eau (Carrea & Riva, 2008).

On peut noter également que le solvant influence le nombre et la taille des produits d'oxydation. Dans l'étude menée par Mustafa et ses collègues (2005), l'oxydation de l'acide férulique en présence de la laccase de *Myceliophthora thermophila* a été menée en milieu aqueux et en milieu diphasique émulsionné (acétate d'éthyle 80% - tampon phosphate 20%). Dix produits d'oxydation ont été identifiés dans le milieu aqueux, contre trois seulement dans le milieu diphasique (Mustafa et al., 2005).

1.9.2 Influence du pH

Le pH optimal des laccases dépend des substrats et de l'origine de l'enzyme. Dans le cas où le substrat est un phénol, le pH optimal des laccases fongiques varie de 3 à 8 ; il peut aller jusqu'à 9 pour les laccases des plantes. En utilisant l'ABTS comme substrat, le pH optimal est plus acide et se situe entre 3 et 5 (Madhavi & Lele, 2009).

Par ailleurs, le pH du milieu influence le potentiel redox des partenaires de la réaction. Il est admis que : $E^\circ (\text{Substrat}) \leq E^\circ (\text{Enzyme}) \leq E^\circ (\text{O}_2/\text{H}_2\text{O})$ (Feng Xu, 1997).

Influence du pH sur le potentiel redox du substrat : à pH élevé, la fixation des groupements hydroxyle déprotonés du substrat sur le cuivre du site actif (T2 ou T3) empêche le transfert interne des électrons , conduisant à une diminution de l'activité enzymatique (Feng Xu, 1997).

Influence du pH sur le potentiel redox de l'enzyme : le potentiel redox des laccases change avec le pH. Ainsi, il a été montré que le potentiel redox de la laccase de *Myceliophthora*

thermophila augmente quand le pH passe de 7 à 11, provoquant une amélioration de l'activité enzymatique (Feng Xu, 1997).

Influence du pH sur le potentiel redox de l'oxygène : quand le pH augmente jusqu'à 11, le potentiel du couple (O_2/H_2O) diminue. Ceci entraîne une diminution de la vitesse de transfert des électrons dans le système et donc une diminution de la vitesse de la réaction (Feng Xu, 1997).

1.9.3 Influence de la température

La température optimale des laccases varie essentiellement selon la source de l'enzyme. La plupart des laccases sont stables et actives dans une plage de températures allant de 30 °C à 50 °C (Nagai et al., 2002). Ainsi, Asgher et al., 2012 ont constaté que l'activité maximale de la laccase de *Trametes versicolor* est obtenue à 40 °C. A des températures supérieures à 60 °C, une perte d'activité due à la dénaturation de l'enzyme est observée. La thermostabilité de l'enzyme dépend de plusieurs facteurs :

- La structure de l'enzyme : la thermostabilité augmente avec le nombre de ponts disulfures pouvant s'établir au sein de la protéine (Whitehurst & Oort, 2009).
- La nature et le pH du milieu : la thermostabilité de l'enzyme est plus élevée en milieu organique et/ou alcalin ou neutre, qu'en milieu aqueux et/ou acide parce que les molécules d'eau libre participent à la dénaturation thermique de l'enzyme (Salleh & Basri, 2006).
- La forme de l'enzyme : les enzymes immobilisées sont plus thermorésistantes que les enzymes libres (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011).

1.9.4 Influence des activateurs / inhibiteurs

Des études ont montré que l'azide, l'acide thioglycolique et l'acide diéthyl-dithiocarbamique sont des inhibiteurs des laccases. Capables de se lier aux cuivres de type 2 et 3 du site actif des laccases, ces molécules bloquent le transfert interne d'électrons et causent par suite une inhibition de l'activité. D'autres inhibiteurs de l'activité laccasique sont connus, tels que

les ions métalliques (Hg^{+2}), les thiocyanates ou encore les détergents cationiques (Madhavi & Lele, 2009). La cystéine est l'inhibiteur le plus efficace des laccases, suivi par L'EDTA. Au contraire, les ions Cu^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} sont des stimulateurs des laccases. L'activation des laccases due à l'addition des ions Cu^{2+} peut être expliquée par le remplissage du site de liaison de type 2 par des ions de cuivre (Asgher et al., 2012).

I.10 Produits d'oxydation des laccases

Les *ortho-* / *para-* quinones sont les produits primaires de l'oxydation enzymatique des phénols. Ce sont des espèces très instables et fortement électrophiles absorbant dans le visible des couleurs allant du jaune brillant (catéchine) ou rose (acide caféique) en passant par le jaune orangé (acide chlorogénique) jusqu'au brun (Kermasha, Bao, Bisakowski, & Yaylayan, 2002). Ces espèces très réactives sont rapidement impliquées dans d'autres réactions, qui conduisent à la formation de nouveaux composés dont certains sont colorés.

I.11 Réactivité des quinones et additions nucléophiles

I.11.1 Réactivité avec l'eau

Les quinones sont instables en milieu aqueux. Ces espèces réagissent avec l'eau en donnant des trihydroxybenzènes ; ceux-ci réagissent ensuite avec d'autres quinones pour former des hydroxyquinones, qui sont enfin le siège d'une condensation oxydative pour donner des polymères. Par contre, dans un milieu organique, les réactions de polymérisation des quinones sont défavorisées (Mustafa et al., 2005).

I.11.2 Réactivité avec les amines et leurs dérivés (amination)-Additions nucléophiles

Les quinones peuvent réagir avec les groupements amines terminaux de molécules nucléophiles telles que les amines et leurs dérivés. Des liaisons covalentes stables (C-N) sont établies, conduisant à la formation d'amino-quinones, sous forme soit de base de Schiff, soit d'adduit michaélien (Figure 10).

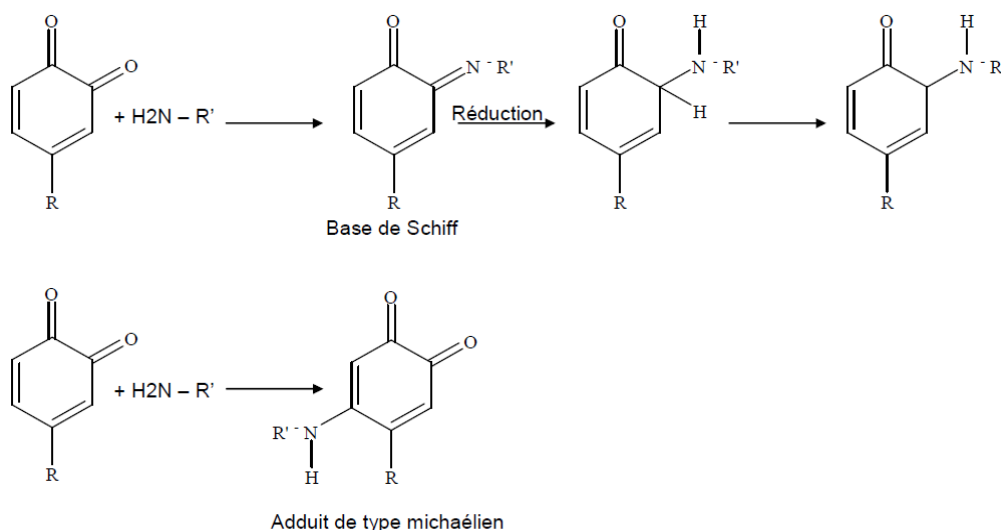


Figure 10 : Réactions entre les quinones et les amines conduisant à des bases de Schiff et des adduits de type michaélien (Guneet Kumar, Smith, & Payne, 1999)

Les quinones peuvent réagir avec les groupements amines d'acides aminés libres comme la lysine, la tyrosine ainsi qu'avec ces acides aminés associés au sein d'un peptide (Tyrosine-Lysine) (Mikolasch et al., 2010). D'autres travaux rapportent des réactions avec la protéine β -lactoglobuline (Jung & Wicker, 2012a). D'autres molécules non peptidiques comportant des groupements amine peuvent réagir avec les quinones. C'est le cas du chitosane (Aljawish, Chevalot, Jasniewski, Paris, et al., 2014) ou du polyamide/ n-Butylamine (Acero et al., 2012).

I.11.3 Réactivité avec les autres phénols

En général, les quinones formées par oxydation sont impliquées dans des réactions de couplage pour former des dimères, des oligomères ou des polymères. Les *ortho*- ou *para*-quinones peuvent former des dimères homogènes en réagissant avec une même molécule de phénol. Ces dimères résultent de la formation de nouvelles liaisons de type biphényle entre 2 atomes de carbone (C-C) ou biphényle-éther entre un atome de carbone et un atome d'oxygène (C-O). En outre, des dimères hétérogènes peuvent être formés si les quinones réagissent avec des entités phénoliques de nature différente (Mikolasch et al., 2010).

I.12 Applications biotechnologiques des laccases

En raison de leur large spécificité de substrat et de leur biodégradabilité, les laccases participent au développement de procédés industriels efficaces, durables et respectueux de l'environnement. Des applications biotechnologiques impliquant des laccases, telles que le contrôle de la pollution de l'environnement, l'industrie alimentaire, l'industrie textile, l'industrie pharmaceutique et cosmétique, et le développement de biocapteurs se révèlent très prometteuses. Celles-ci sont décrites ci-après.

I.12.1 Applications environnementales

Traitement des eaux polluées : Les laccases semblent être un biocatalyseur prometteur pour améliorer la biodégradation des micropolluants dans les eaux usées, dans une étape de traitement complémentaire (Ba, Arsenault, Hassani, Jones, & Cabana, 2013; Chandra & Chowdhary, 2015; Margot et al., 2013). Les laccases pourraient être utilisées aussi pour décolorer les effluents, en dégradant les composés phénoliques colorés contenus dans les eaux résiduelles des brasseries (Solís-Oba, Almendáriz, & Viniegra-González, 2008). Elles réduisent la phytotoxicité des sous-produits agricoles, y compris les déchets issus de l'extraction de l'huile d'olive ou de la pulpe de café, permettant ainsi leur réutilisation en tant qu'agents fertilisants pour des cultures (Quaratino et al., 2007).

Bioremédiation de sols contaminés : plusieurs études ont montré la capacité des laccases fongiques à dégrader ou à polymériser les polluants organiques toxiques contenus dans le sol, tels que les xénobiotiques, les herbicides (isoxaflutole), les pesticides (chlorophénol), le bisphénol A (BPA) et autres contaminants (Alcalde, Ferrer, Plou, & Ballesteros, 2006; Kudanga et al., 2011; Viswanath et al., 2014).

I.12.2 Industries agro-alimentaires

De nombreux substrats des laccases, tels que les glucides, les acides gras insaturés, les phénols, et les protéines contenant des thiols, sont des composantes importantes de divers

aliments et boissons. Leur modification par les laccases peut conduire à de nouvelles fonctionnalités, une amélioration de la qualité ou une réduction des coûts (Kirk, Borchert, & Fuglsang, 2002). Par exemple, la laccase induit la gélification de la pectine de betterave et participe aussi à l'amélioration la stabilité de l'émulsion huile-dans-eau (Osma, Toca-Herrera, & Rodríguez-Couto, 2010).

Les laccases peuvent être utilisées pour améliorer ou modifier la couleur des aliments et des boissons par l'élimination de composés phénoliques indésirables, responsables du brunissement, de la formation de la brume et de la turbidité des jus de fruits, de la bière et du vin (Shraddha et al., 2011). De plus, des travaux ont montré que la laccase de champignon est capable d'augmenter la résistance de la pâte et de diminuer son extensibilité dans la farine et dans la pâte de gluten (Brijwani et al., 2010).

Le dioxygène est, la plupart du temps, nuisible à la qualité des aliments et des boissons au cours de leur stockage ou de leur transformation, en provoquant leur altération oxydative. Les laccases peuvent être utilisées comme agents piègeurs de l'oxygène pour une meilleure conservation des aliments (Farneth, Hasty, Damore, & Chisholm, 2005). Des traitements enzymatiques impliquant les laccases ont été proposés pour stabiliser les jus de fruit et le vin, pour améliorer la saveur des huiles végétales ainsi que la couleur d'un produit à base de thé (Kunamneni et al., 2008). Une laccase est également utilisée pour réticuler l'acide férulique et la pectine de betterave *via* un couplage oxydatif pour former des gels utilisés comme ingrédients alimentaires (Zaidel et al., 2012).

I.12.3 Industrie pharmaceutique

Les laccases ont la capacité de modifier des molécules bioactives et d'en synthétiser de nouvelles pouvant intéresser l'industrie pharmaceutique, dans des conditions douces. Elles ont ainsi été utilisées pour catalyser des réactions de couplage oxydatif conduisant à la synthèse des composés actifs comme des antimicrobiens, des détoxifiants, des anesthésiques, des anti-

inflammatoires (Pannu & Kapoor, 2014). Des antibiotiques ont également été produits à partir de couplages catalysés par des laccases. On peut citer la vinblastine, la mitomycine, le dimère X de pénicilline, les céphalosporines (Kudanga et al., 2011). Dans une autre étude, le couplage des dérivés de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque à l'ampicilline ou l'amoxicilline, catalysé par la laccase de *Trames spec.* a permis la synthèse de 8 nouveaux antibiotiques: pénicillines, avec des activités comparable à l'ampicilline et amoxicilline (Mikolasch et al., 2006).

Les laccases pourraient être utilisées pour synthétiser des acides aminés présentant des propriétés biologiques intéressantes et pouvant être la base de nouveaux composés pharmaceutiques. Par exemple, la laccase est capable de former une liaison C-N entre le L-phénylalanine et différents para-hydroquinones aboutissant à des dérivés d'acide aminé mono- et diaminé. Ces dérivés ont un potentiel important dans le développement de nouveaux adhésifs et autres biomatériaux (Hahn et al. 2009). De plus, des substrats dihydroxylés de la laccase peuvent être couplés au tryptophane, à la phénylalanine ou la L-lysine pour former de nouveaux adhésifs médicaux, chirurgicaux et dentaires (Mikolasch et al., 2010).

I.12.4 Biocapteurs

Un certain nombre de capteurs ont été développés en se basant sur la capacité des laccases à catalyser des réactions de couplage. Ainsi, des études rapportent la fabrication de biocapteurs impliquant une laccase (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). Le principe de ces derniers est basé sur le fait que la laccase réduit l'oxygène en eau ; le capteur suit la consommation de l'oxygène durant l'oxydation de l'analyte.

I.12.5 Industries textiles

Les colorants utilisés dans les textiles sont toxiques en raison de la présence de composés aromatiques et de chlorures métalliques. Ceci justifie l'augmentation de la demande pour éliminer les colorants des effluents industriels. Les laccases sont apparues comme des outils intéressants pour traiter les teintures en raison de leur capacité à dégrader différents colorants

et à catalyser des réactions de couplage entraînant une élimination des colorants (S. S. Desai & Nityanand, 2011; Moilanen, Osmä, Winqvist, Leisola, & Couto, 2010).

Les laccases pourraient être utilisées aussi pour fixer des molécules fonctionnelles comme le gallate de lauryle (Hossain, González, Lozano, & Tzanov, 2009) ou l'acide férulique (Sun, Xing, & Tang, 2015) sur les fibres textiles telles que la laine, le coton, le nylon... Ceci permettrait d'obtenir des textiles multifonctionnels présentant des propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-UV.

De plus, les laccases peuvent teinter les fibres textiles. Par exemple, les réactions de couplage entre des méthoxyphénols et le 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone catalysées par la laccase produisent un azo-colorant rouge. La laccase, peut catalyser la dégradation oxydative de colorants azoïques ce qui permet la décoloration des effluents des industries textiles (Kudanga et al., 2011; Setti, Giuliani, Spinozzi, & Pifferi, 1999).

I.12.6 Industries cosmétiques

Un nouveau domaine d'application des laccases est la cosmétique. Des préparations cosmétiques et dermatologiques contenant des protéines laccasiques pour blanchir la peau ont été développées (Golz-Berner, Walzel, Zastrow, & Doucet, 2007).

Des laccases ont été utilisées pour développer des produits de soins comme les déodorants, les dentifrices, les détergents, les savons et les couches (Kunamneni et al., 2008) ainsi que dans des colorants pour cheveux. Ces derniers sont moins irritants et plus faciles à appliquer que les colorations actuellement utilisées car les laccases remplacent des produits chimiques tels que H_2O_2 en milieu alcalin. Des chercheurs ont utilisé la laccase de *Trametes versicolor* pour catalyser la polymérisation de précurseurs phénoliques (15 composés ont été testés). Les produits résultant de cette polymérisation sont colorés. Une large palette de couleurs a été obtenue en mélangeant deux monomères phénoliques (Jeon et al., 2010).

**Revue bibliographique sur les
polysaccharides et leurs modifications
enzymatique**

II. Revue de synthèse bibliographique

II.1 Introduction

Les polysaccharides constituent une classe importante de polymères biologiques présents dans presque tous les organismes vivants tels que les algues, les plantes, les micro-organismes et les animaux (Sinha & Kumria, 2001). La plupart de ces polymères sont biologiquement inertes, biodégradables et polyfonctionnels.

Pourtant, leur utilisation sous leur forme native n'est pas toujours commode (solubilité parfois limitée, dispersion difficile dans différentes matrices, balance hydrophile / hydrophobe inadaptée). Pour ces raisons, différentes méthodes (physiques, chimiques et biologiques) ont été conçues pour modifier leur structure et améliorer leurs propriétés physiques, chimiques et mécaniques. Ces méthodes mettent à contribution les différents groupements fonctionnels (hydroxyles, amines, carboxyles ...) présents dans la structure des polysaccharides.

Ce chapitre est une synthèse bibliographique portant sur quatre polysaccharides particulièrement abondants dans la nature : la cellulose, l'amidon, la pectine et le chitosane. Elle se présente sous la forme d'une revue acceptée après modification dans le journal 'Enzyme and Microbial Technology'. Après un rappel de la structure, des sources, propriétés et applications des polysaccharides, le travail de revue se focalise sur les différentes modifications enzymatiques appliquées aux polysaccharides et rapportées dans la littérature. Les principales voies de transformations décrites sont des réactions d'oxydation, d'acylation/estérification, de phosphorylation et de copolymérisation. Cette étude bibliographique permettra de faire le point sur les principales avancées scientifiques concernant la fonctionnalisation enzymatique de polysaccharides et de positionner notre travail de fonctionnalisation de la pectine.

II.2 Enzymatic modification of polysaccharides: mechanisms, properties, and potential applications. A review

Nadine Karaki¹, Abdulhadi Aljawish¹, Catherine Humeau², Lionel Muniglia¹, and Jordane Jasniewski^{*}

^{1*} Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

*Corresponding author: jordan.jasniewski@univ-lorraine.fr

Article accepté au « Enzyme and Microbial Technology » avec modifications

Abstract

Polysaccharides are natural biopolymers found in almost all living organisms. They are used extensively in various industrial applications, such as food, adhesives, pharmaceuticals, and cosmetics. In many cases, their practical use is limited because of their weak solubility in neutral pH and their unsuitable hydrophilic / hydrophobic balance. In this context, chemical or enzymatic modification of their structure appears as a relevant way, to improve their properties, and thus to enlarge the field of their potential applications. Taking into account the reduction of the input energy and the environmental impact, and due to high specificity and selectivity properties, enzymatic bioprocesses have been investigated as attractive alternatives to toxic and non-specific chemical approaches. This review discusses the methods of enzymatic functionalization of four well-known polysaccharides, chitosan, cellulose, pectin and starch. Particular emphasis was placed on the methods, the reaction types such as oxido-reduction, esterification, and copolymerization. The impact of functionalization on the properties and the applications of polysaccharide derivatives was described.

Keywords: Functionalization, enzyme, chitosan, cellulose, pectin, starch.

Highlights:

- The main enzymatic pathways for the modification of four well-known polysaccharides were reported.
- The mechanisms of the different enzymatic reactions were described.
- Structural modifications and functional properties were addressed.
- Potential applications of polysaccharide derivatives were summarized.

I. Introduction

Polysaccharides are an important class of biological polymers joined by glycosidic bonds, universally found in almost all living organisms such as seaweeds (alginate, agar-agar and carrageenan), plants (cellulose, hemicelluloses, pectin and guar gum), microorganisms (dextran and xanthan gum), and animals (hyaluronan, chondroitin, chitin and heparin) [1]. Thus, they constitute interesting renewable sources that can be used for the synthesis of high performance materials [2]. The biological function of polysaccharides is usually either structural or storage-related. For example, starch is a storage polysaccharide in plants, whereas cellulose and chitin are structural polysaccharides respectively in cell walls of plants and exoskeletons of crustaceans [3,4]. Most of these polysaccharides are biologically inert, safe for humans and abundantly available in the natural environment [5]. They possess several other advantages such as low costs, biodegradability in the ecosystem, renewability [6], polyfunctionality, chemical reactivity, chelating and absorptive capacities in the treatment of wastewater [7]. In spite of these properties, the use of these polymers in their native forms is not always convenient (problem of solubility, dispersion in various media, unsuitable hydrophilic / hydrophobic balance). For these reasons, different ways have been tailored to modify their structure, then conferring the necessary physical, chemical and mechanical properties.

Polysaccharides possess many highly reactive groups (acetamido, primary amino, carboxyl and/or hydroxyl groups) that can be involved in various functionalization pathways. In particular, they are characterized by a high hydrophilicity due to the presence of many hydroxyl groups on their composing units [8]. Over the years, many chemical reactions such as oxidation, sulfation, esterification, amidation, have been performed involving the free carboxyl, amino or hydroxyl groups distributed along the polysaccharide backbone [9] aiming to create derivatives with determined/adapted properties [10,11]. These chemical processes usually lead to high conversion yields. Their

main drawbacks, however, remain the toxicity of the chemical reagents used and the lack of selectivity. Faced with these limitations, an increased emphasis on eco-efficiency and green chemistry has driven a search for renewable and environmentally friendly processes.

In the past years, enzymatic bioprocesses have been more and more explored as alternative ways to modify the structure and then the properties of polysaccharides. Their main advantages are a high selectivity and substrate specificity, enabling the synthesis of products with well-defined and/or stereospecific structures [12–15]. In addition, enzymatic reactions can be performed under mild conditions and often lead to less or no undesired by-products contrary to chemical processes that require harsh conditions (e.g. strong acids for nitration and sulfonation) and highly reactive compounds (e.g. chloromethyl methyl ether, ethylene oxide, or acid chlorides) [15]. Such procedures have been successfully performed to graft molecules such as fatty acids, proteins, phenols aiming to improve or create biopolymers with interesting mechanical and/or biofunctional properties.

This review aims to present the different strategies of enzymatic modification applied to four of the most abundant polysaccharides, the chitosan from animal and microbial sources and the polysaccharides isolated from vegetal sources in the order of their natural abundance cellulose, pectin and starch (Figure 1).

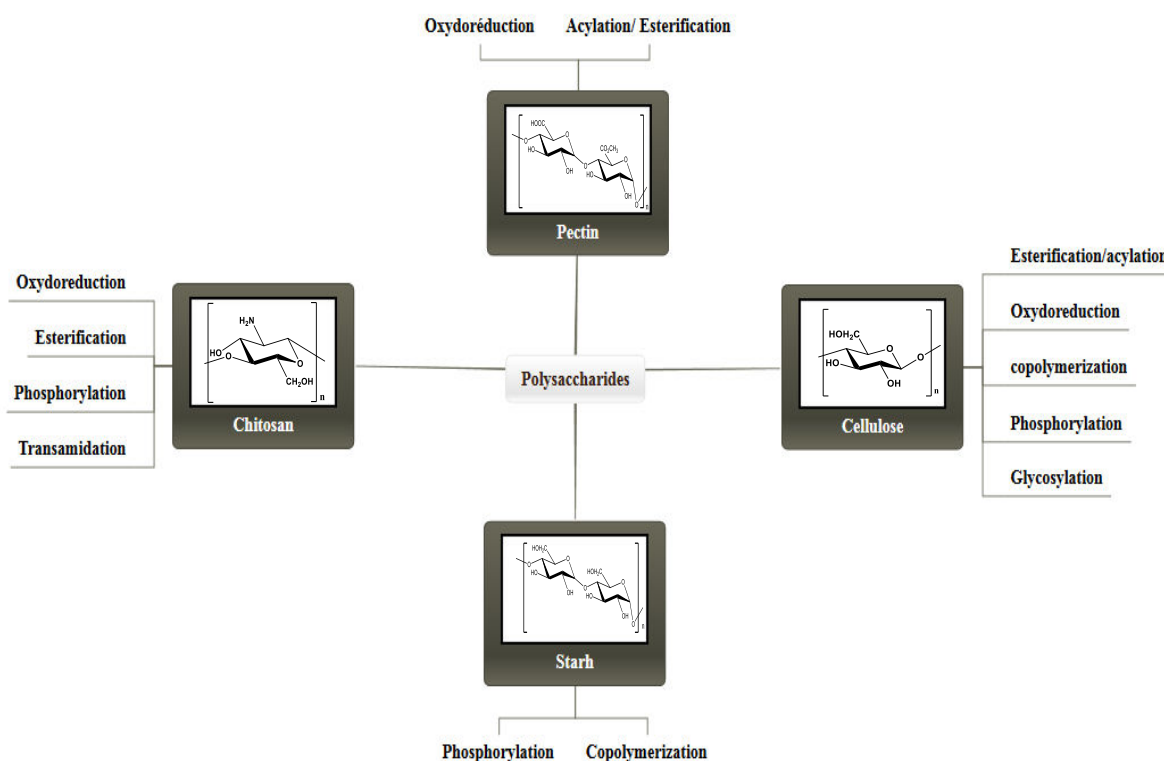


Figure 1: Summary of the different enzymatic modifications applied to chitosan, cellulose, pectin and starch, mentioned in the review

II. Chitosan

Chitosan is the second most abundant polymer in nature after cellulose and derives from N-deacetylation of chitin in the presence of hot alkali [16]. Chitosan is a linear polysaccharide, essentially composed of β (1-4) D-glucosamine (GlcN) linked to N-acetyl- D-glucosamine residues (GlcNAc). This polymer is found in the shellfish waste from shrimp, crab and lobster [17] as well as in the mycelia of various fungi including Ascomycetes, Zygomycetes, Basidiomycetes and Deuteromycetes [18]. The properties of chitosan are greatly affected by its structure, which is correlated with the conditions under which it is processed. The deacetylation degree (DD) of chitosan is extremely important because it affects some physicochemical properties such as the solubility, the flexibility, the conformation of the polymer and hence the viscosity it may induce [19]. Chitosan is a weak base with pKa values ranging from 6.2 to 6.5.

The soluble-insoluble transition occurs at pH between 6 and 6.5 which is a particularly convenient range for biological applications [20].

II.1 Applications

Chitosan has many intrinsic functional properties that make it an attractive material in various applications as presented in the Table 1 [21].

Table 1: Some applications of chitosan

Application fields	Properties and uses	References
Food	Antimicrobial and preservative agent, Edible film	[22], [23]
	Accelerate calcium and iron absorption	[24]
	Dietary fiber	[25]
Pharmaceutical & medical	Protective effect on bacterial infection	[26]
	Immuno-enhancing, antitumor agent	[27]
	Anti-ulcer and anti-acid action	[28]
	Carrier for drug and DNA delivery system	[29]
	Hypocholesterolemic and antioxidant	[30]
	Accelerator of wound healing and absorbable surgical suture	[31]
Biotechnology	Support for immobilized enzymes	[32]
	Porous beads for bioreactors	[33]
	Resin for chromatography	[33]
	Membrane material	[33]
Environment	Wastewater treatment	[34]
Agriculture	Seed coating preparation	[35]
	Activator of plant cells	[36]
	Antimicrobial activity for plant pathogen	[36]
Cosmetic	Water-retaining and moisturizing agent; component, hand and body creams, shampoos and toothpastes	[37]

II.2 Enzymatic modifications

Thanks to the presence of reactive -OH and -NH₂ groups on chitosan structure, many enzymatic modifications have been performed under homogeneous or heterogeneous conditions, aiming to improve the properties of the polymer and even create new functions [38].

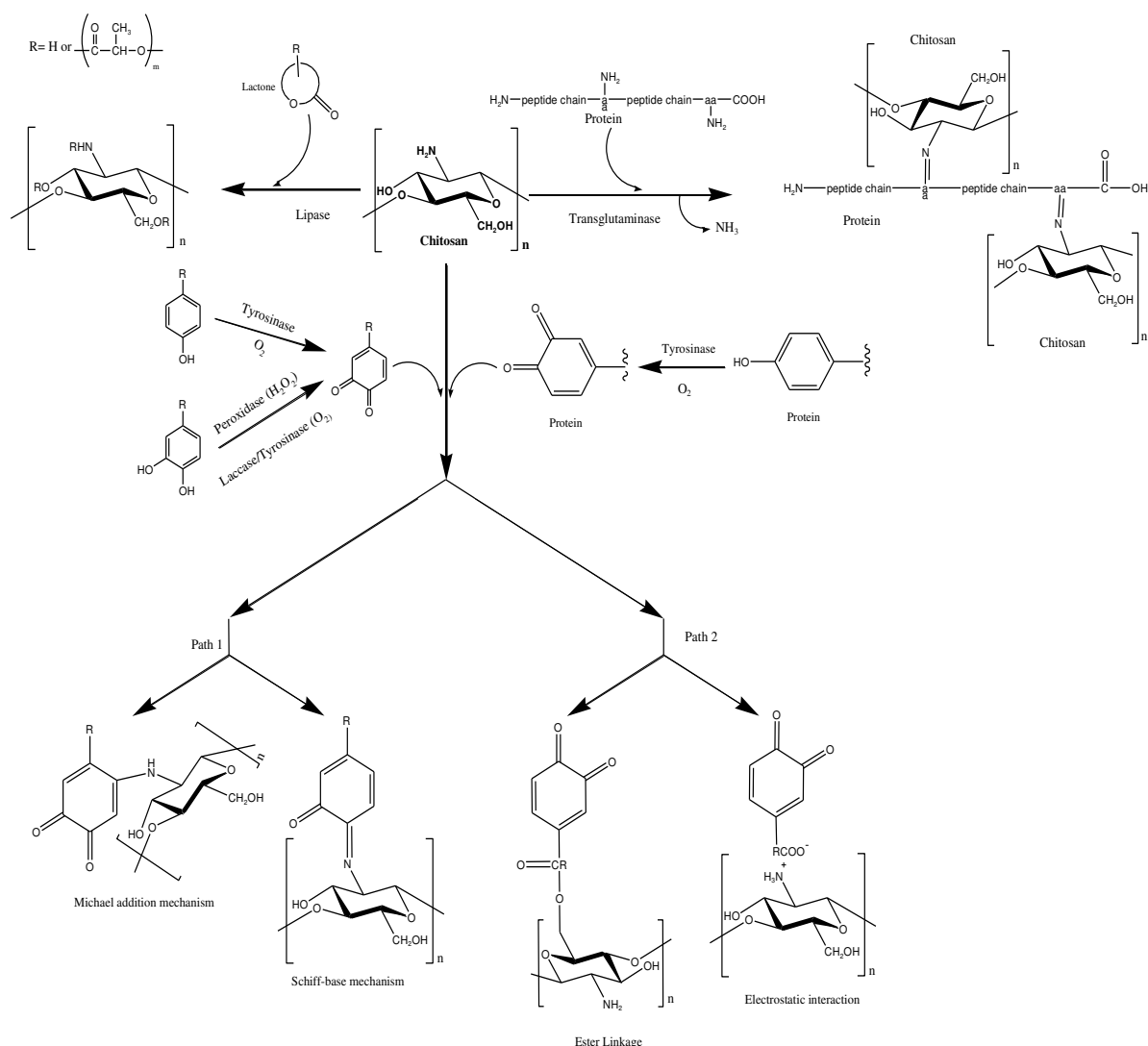


Figure 2: Enzymatic routes of chitosan functionalization using polyphenol oxidases.

Structures possibly obtained are shown in the figure.

Flavonoids can only react in heterogeneous conditions (path1) forming either a Schiff base or a Michael adduct.

Phenolic acids can in turn react under heterogeneous (path 1) or homogeneous conditions (path 2).

“aa” can be any amino acid having NH₂ on his lateral chain

II.2.1 Oxido-reduction

On a fundamental level, redox transformations are a family of reactions that are concerned with the transfer of electrons between species. Among them, polymerization reaction can be performed. Free radicals are produced in the redox initiation system by oxidation of the substrate, which in turn initiates polymerization and the conceivable mechanism for copolymer formation [39].

- **Grafting of phenolic compounds onto chitosan**

Tyrosinases, peroxidases, and laccases constitute the three classes of enzymes that were used for the grafting of phenolic entities onto chitosan. In 2002, Aberg and co-authors worked on the enzymatic functionalization of chitosan with arbutin aiming to improve its functional properties. Arbutin is a natural low-molecular-weight phenolic acid found in pears. Homogeneous reactions were performed in solutions containing chitosan, arbutin and tyrosinase at room temperature, at pH around 6. Generally, tyrosinase was known to catalyze both o-hydroxylation of monophenols to o-diphenols, and oxidation of o-diphenols to o-quinones. The quinones formed are highly reactive compounds, which may suffer nucleophilic attack (non-enzymatic reaction) of other phenolic groups, amino acids, peptides or proteins (Figure 2). After 7 h of reaction, the viscosity of the solution increased and a gel was formed due to the grafting of arbutin oxidation intermediates onto chitosan. Additionally, this gel was shown to be easily broken in the presence of chitosanase, proving that the chitosan derivatives remain biodegradable [40].

Tyrosinase was also used as a catalyst for the grafting of hexyloxyphenol onto chitosan under homogeneous conditions (where chitosan is soluble in the acidic reaction media) and heterogeneous conditions (where chitosan is insoluble in the reaction media at pH 7.5-8 [41]. The spectral studies showed a modification of chitosan structure that could explain changes in its physicochemical properties. Based on contact angle measurements, the heterogeneous modification of a chitosan film produced a hydrophobic surface due to the substituent. On the contrary, homogeneous conditions led to a polymer that exhibited the same rheological behavior as a water-soluble polymer [42,43].

Chlorogenic acid is a natural non-chlorinated compound which structure contains a carboxyl group, secondary hydroxyl groups and phenolic groups. It is the major secondary metabolite that accumulates in coffee seeds [44]. The enzymatic crosslinking between chitosan

and chlorogenic acid was performed by using mushroom tyrosinase (MT). By applying slightly acidic conditions (pH 6), it was possible to modify chitosan with chlorogenic acid under homogeneous conditions. The derivative produced was found to be soluble under both acidic and basic conditions but insoluble under near-neutral pH. The increase in chitosan solubility in base was explained by the carboxylate and hydroxyl groups of the quinic acid moiety generated from chlorogenic acid [45]. Later on, Kumar et al., (2000) produced gels by reacting chitosan with p-cresol in the presence of MT under homogeneous conditions. The derivative was shown to result from the grafting of the low molecular weight phenolic substrate (p-cresol) onto chitosan amino groups. These results were confirmed by Wu et al. (2000) [46].

In a study aiming to graft chitosan fibers with different flavonoids (flavanols, flavonols, flavone, flavanone, isoflavone), tyrosinase was used as a catalyst [47]. Tyrosinase was capable to oxidize selected flavonoids to the corresponding o-quinones, which covalently bound to chitosan amino groups. This modification allowed increasing the antioxidant and antimicrobial activities of chitosan fibers [47]. Similarly, another study was conducted on fisetin and quercetin grafting onto chitosan-based viscose fibers. An increase in the antioxidant activity of fibers and a decrease in their antimicrobial efficiency were observed [48].

In the study conducted by Chao et al., (2004), chitosan was modified aiming to provide the ability to adsorb cationic dyes from water. Four kinds of phenol derivatives were used as substrates of tyrosinase: 4-hydroxybenzoic acid (BA), 3,4-dihydroxybenzoic acid (DBA), 3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid (PA), hydrocaffeic acid (CA). FTIR analyses demonstrated that chitosan amino groups were partially modified by products obtained from tyrosinase-catalyzed oxidation of phenol derivative. To assay the adsorption of cationic dyes, Langmuir type adsorption was used. The maximum adsorption capacities for both dyes (crystal violet and bismarck brown Y) were increased with the following order chitosan-CA > chitosan-PA > chitosan-DBA > chitosan BA [49].

Moreover, mushroom tyrosinase was shown to mediate the grafting of caffeic acid onto chitosan in phosphate buffer at pH 7 and possibly led to the covalent crosslinking of chitosan. This reaction confers mechanical and redox properties to chitosan films [50]. However, the main disadvantage of using tyrosinase is that reactions involving quinones may be hard to control, leading to a mixture of structures including monomeric and oligomeric phenolic substituents [51].

In another study aiming to investigate the effects of grafting hydrophobic phenolic compounds on the packaging-related surface properties of chitosan coatings, tyrosinase from *Trichoderma reesei* fungus was used. This latter catalyzed the grafting of octyl gallate and dodecyl gallate onto chitosan amino groups at pH 6. Solutions containing chitosan/gallate derivatives were applied as functional coating on food packaging materials. Resulting coatings exhibited strong antimicrobial activity against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua* [52]. Similarly, chitosan/gallate conjugates were produced using Horseradish peroxidase (HRP) with the aim of enhancing the antimicrobial activity of native chitosan against *E. coli* and *Listeria monocytogenes* as well as its antioxidant activity [53,54].

Sakai et al., (2009) demonstrated that the incorporation of phenolic groups onto chitosan further enlarges its applications especially in tissue engineering and in drug delivery as injectable hydrogels. The reaction was performed in a chemoenzymatic approach made of two steps: the first one is the chemical conjugation of chitosan with phenolic hydroxyl groups of 3-(p-hydroxyphenyl) propionic acid, using aqueous-phase carbodiimide activation. Then, chitosan derivatives were produced in a second step using a peroxidase in the presence of H₂O₂. These derivatives were soluble at neutral pH and jellified within seconds [55].

In another study aiming to develop an oxidized polysaccharide-based hydrogel useful for tissue regeneration, a chemoenzymatic reaction was performed. The first step consists in the chemical oxidation of chitosan with periodate. The second step is the enzymatic conjugation

between tyramine-functionalized polyethylene glycol-nitrophenyl carbonate ester and oxidized chitosan catalyzed by the horseradish peroxidase (HRP) in the presence of hydrogen peroxide. The oxidized chitosan backbone formed via the Schiff-base reaction, was expected to enhance the interlinkage between the hydrogel layer and collagen in the tissues. The hydrogel was rapidly formed in situ in the presence of HRP. The hydrogel exhibited high tissue adhesion strength on porcine skin models as well as good tissue-adhesive ability and wound healing properties on rabbit skin [56].

In order to develop natural substitutes to synthetic polymers and new polymer processing methodologies, Vachoud et al., (2001) studied the ability of HRP to catalyze the enzymatic functionalization of chitosan with dodecyl gallate (DDG). Gallates are natural phenols derived from plant tannins. A chitosan solution was incubated with DDG, H₂O₂, and peroxidase (HRP); the reaction medium was 20% ethanol in aqueous buffer (pH 4.5). In this medium, chitosan was soluble while DDG was only partially soluble leading to a suspension. The reaction mixture was stirred for 75 min at room temperature. HRP allowed the conversion of phenolic substrates into free radical intermediates that underwent a complex set of non-enzymatic reactions involving chitosan amino groups (Figure 2). Analyses provided evidence of the grafting of phenolic moieties onto chitosan [57]. A similar study was performed to graft gallic acid onto chitosan using HRP and H₂O₂. The resulting product: chitosan gallate was a novel type of polysaccharide antioxidant, with a better water solubility than chitosan [58].

Torres et al., (2012) studied the synthesis of chitosan-flavonoid conjugates by enzymatic treatment with chloroperoxidase (CPO, EC 1.11.1.10). In this work, the CPO oxidized flavonoids in a biphasic medium (20% isopropanol and 80% acetate buffer) in the presence of H₂O₂ and chitosan. Oxidation adducts were produced from the reaction between the catechol (o-quinone) moiety of flavonoids and the chitosan amino groups (Figure 2). In this study, quercetin, rutin, naringin, hesperidin were shown to be good substrates for the CPO contrarily

to chrysin. However, only intermediates produced from quercetin could be linked to chitosan. Due to enzymatic treatment, some properties of chitosan were improved such as plastic, antioxidant and antimicrobial properties as well as thermal degradability. The chitosan quercetin bioconjugates were used as edible films to diminish browning on *Opuntia ficus indica* cladodes.

In another study, chitosan was enzymatically functionalized with catechol, caffeic acid and dihydroxybenzoic acid using laccase from *Trametes hirsuta* at pH 4.5 and 37 °C in order to increase iron chelating capacity of the polysaccharide [59]. On a mechanistic viewpoint, laccase from *Trametes hirsuta* can oxidize catechol resulting in the formation of free radicals that react with chitosan NH₂ groups (Figure 2). Results indicated that catechol, caffeic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid were readily coupled onto glucosamine (model substrate representing the monomeric unit of chitosan) in a 1:1 molar ratio. This enzymatic coupling led to a decrease in free NH₂ groups and subsequent exponential increase in iron-chelating ability of chitosan. Microspheres made from chitosan derivatives can potentially be used either therapeutically or prophylactically for iron overload problems in humans [59].

Chitosan particles were functionalized with ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) as phenolic substrates using laccase from *Myceliophthora thermophyla*. This enzyme is able to oxidize ortho- and para-diphenols, methoxy-phenols, aromatic amines and monophenols [60] and is active in aqueous medium at room temperature and neutral pH [61]. The functionalization of chitosan was performed on C-2 via a mechanism of Schiff base (the formation of a C=N bond was proven by FTIR analyses). This enzymatic reaction allowed the formation of chitosan derivatives with improved antioxidant properties, especially for those including ferulic acid [62–64]. Another reaction involving chitosan was performed aiming to reduce the environmental impact of effluents containing valuable corn phytochemicals, such as ferulic acid and its derivatives, from the tortilla industry. Wastewater was enzymatically oxidized by adding

laccase from *Coriolopsis gallica* at pH 4.5–6 and purified by adding a low molecular weight chitosan. The reaction was incubated for 24 h at 25 °C. The obtained results showed a decrease in the chemical oxygen demand of effluents and, at the same time, the generation of polymers with potential applications in the food and pharmaceutical industries [65].

In another study done by Božič et al., 2012, laccase from *Trametes versicolor* was used to functionalize chitosan with caffeic acid (CA) or gallic acid (GA) at different pH levels, knowing that chitosan is soluble under acidic conditions. For this purpose, two modes of grafting were done: homogeneous (pH 4.5) and heterogeneous (pH 6.5). Results showed that the chitosan modified at a pH value of 4.5 presented the highest antioxidant activity. Moreover, this modification increased the antibacterial activity of chitosan against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [66].

- Grafting of protein based substrates onto chitosan

Many researchers studied the enzymatic coupling of various proteins with chitosan. Sericin peptides from silk fibers constitute interesting compounds that can be purified from industrial wastewater. They were coupled with chitosan using the tyrosinase of *Agaricus bisporus* under homogeneous condition. The reaction was conducted at room temperature, for 24h, in phosphate buffer (pH 6.5). The formation of sericin-chitosan conjugates via Michael addition mechanism was proven by infrared spectra (changes in the NH stretching region). 57% of sericin tyrosine residues were oxidized [67]. This coupling allowed complementing the intrinsic properties of the polysaccharide (antimicrobial activity) with the new ones brought by sericin (UV-resistant, moisturizing, antioxidant ...).

Another protein extracted from silk is fibroin. This natural polymer derived from *Bombyx mori* cocoons is used as a textile fiber, and is considered as an ideal biomaterial suitable for biomedical applications, particularly in the emerging field of tissue engineering [68].

Mushroom tyrosinase (MT) catalyzed the oxidation of fibroin tyrosine residues to electrophilic o-quinones. These Then, these quinones coupled with chitosan by a non-enzymatic reaction involving the nucleophilic amino groups of chitosan via a Schiff-base or a Michael addition mechanism. The grafting yield was correlated to the reaction time, the pH level and the MT/fibroin ratio. The highest grafting yield was obtained at pH 7, which is more favorable to MT activity than for chitosan solubility. This suggested that the determining step of the grafting reaction is the formation of o-quinones [69]. According to Monti et al., 2005, chitosan was effectively grafted onto oxidized silk, probably through a Schiff-base mechanism, as shown by the imine band observed at about 1646 cm⁻¹ [70]. As a result, chitosan grafting caused a β -sheet random coil conformational transition of silk fibroin leading to significant changes in thermal behavior [71] as well as improved dyeability crinkling resistance, and antibacterial activity [72].

Mushroom tyrosinase (MT) was known to provide an easy and secure way to convert food-processing byproducts as casein hydrolysates into environmentally friendly products that can offer useful functional properties. MT selectively reacts with fragments of peptides containing accessible tyrosine residues leading to quinone intermediates. In the presence of chitosan, these fragments grafted onto the polymer. In this reaction, quinones are expected to react with chitosan due to the abundance and the reactivity of its nucleophilic primary amino groups rather than with the N-terminal or the side-chain amino groups of the peptides. This enzymatic reaction may provide “green” alternative products with viscoelastic properties [73].

In another study, tyrosinase was used to graft chitosan to a neurotransmitter called dopamine or 3,4-dihydroxyphenethylamine, which was implicated as a potential mediating factor in a variety of neurodegenerative disorders. Dopamine can be oxidized by tyrosinase to form a reactive dopamine quinone that can covalently graft onto chitosan. The study done by

Yamada and collaborators in 2000, showed the possibility to use this reaction to confer water-resistant adhesive properties to semi-dilute solutions of chitosan [74].

The following proteins, organophosphorus hydrolase (OPH), horseradish peroxidase, cytochrome c and recombinant chloramphenicol acetyltransferase (CAT) were coupled with chitosan films by tyrosinase-mediated reaction in the presence of various phenolic coupling precursors (gallate ester, caffeic acid, chlorogenic acid, arbutin and dopamine) as illustrated in Figure 2. The results demonstrated that all proteins except horseradish peroxidase can be grafted onto chitosan and that their biological activities were retained upon coupling.

Moreover, *Trametes sp.* laccase (EC 1.10.3.2) was used to covalently crosslink chitosan and gelatin. A polyphenolic extract from *Hamamelis virginiana* was oxidized and then used as a mediator between chitosan and gelatin in succinate buffer, at pH 4.5. The crosslinking occurred probably via a Michael addition mechanism. A bioactive hydrogel for wound treatment was produced. This was stable under physiological conditions and resistant to lysozyme degradation [75]. Moreover, many studies showed that MT and transglutaminase can mediate the grafting of gelatin chains onto chitosan backbone. The reaction mixture containing gelatin and chitosan was stirred overnight at pH 6, and then the enzyme was added. The microbial transglutaminase (MTGase) catalyzes transamidation reactions leading to the formation of N- ϵ -(γ -glutamyl) lysine that crosslinks with chitosan leading to a gel. For its part, the tyrosinase oxidizes the accessible tyrosine residues of gelatin into reactive quinones that can diffuse from the enzymatic active sites to undergo non-enzymatic reactions with chitosan. The reaction resulted in the formation of a gel with both enzymes. However, the gels obtained with tyrosinase were observed to be relatively weaker than those produced with MTGase and exhibited a limited lifetime [76,77]. Another study demonstrated that gelatin triple helices provided a template to guide the cross-linking process with chitosan by means of MTGase [78]. Wang et al., 2015 reported a process involving both above mentioned enzymes and mixing their

respective mechanisms. The enzymatic reactions were performed under homogeneous conditions in mildly acidic conditions (pH 5.5) and at moderate temperature (30 °C) in the presence of both MTGase and tyrosinase [79]. Once again a gel was obtained. This was characterized by a good biocompatibility, as well as increased mechanical strength, stability, and antibacterial activity. This constitutes a promising material for biomedical films.

In 2010, Sang and co-authors studied the enzymatic crosslinking of gelatin (20% glutamine) to chitosan (90% free amino groups) using MTGase at pH 6. A crosslinked chitosan-gelatin copolymer was formed via Schiff base type associations (Figure 2). The novel polymer combined the characteristics of both chitosan and gelatin, exhibited good antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*, and then could be used for coating meat products [80].

Edible films for food coating and pharmaceutical applications can also be produced by grafting ovalbumin [81], or whey protein [82] onto chitosan, using MTGase. These films showed a low degree of swelling and a good biodegradability after protease or trypsin treatments. The linkage between the chitosan matrix and proteins also enhances the mechanical resistance of chitosan films and helps reducing their permeability to water vapor.

In another vein of application, a study was carried out aiming to enhance some properties of chitosan as moisture absorption and retention ability, antioxidant activity and capacity to promote L929 cells growth. To this end, an enzymatic grafting of collagen peptide onto either chitosan [83] or water-soluble carboxymethyl chitosan [84] was performed using MTGase in phosphate buffer, at pH 6, under homogenous conditions. The results revealed that collagen–chitosan derivatives could provide the ability to repair skin, and then could be promising materials in cosmetic, biomedical and pharmaceutical fields.

II.2.2 Copolymerization

In order to increase the solubility of chitosan and chitin in organic solvents, aliphatic polyester chains were synthesized from lactone species and grafted onto the polysaccharides, in the presence of the porcine pancreatic lipase, at 70 °C, without stirring. Results showed that no copolymerization was obtained with the gamma-butyrolactone whereas the reactivity order for two other lactones was found to be: epsilon-caprolactone > beta-butyrolactone.. In spite of high yields of grafting, all modified polymers remained insoluble in common organic solvents such as hot chloroform, benzene and dimethyl sulfoxide [85].

In order to prepare matrices adapted for cell adhesion and proliferation and that could be applied as scaffold material in tissue engineering and biomaterials, chitosan-graft-poly (L-lactide) copolymers were synthesized. The porcine pancreatic lipase catalyzed the copolymerization of L-lactide onto chitosan at low temperature (50°C), under single-mode microwave irradiation and normal atmospheric pressure (Figure 2). A copolymer with high grafting degree was produced. Its thermal stability and crystallinity was found to be lower than those of native chitosan due to the grafting of poly (L-lactide) chains [86].

In addition to previously mentioned approaches, studies were conducted on the chemo-enzymatic synthesis of amylose-chitosan co-polymers. Maltoheptaose was chemically linked to chitosan amino groups and then acted as a graft for the further phosphorylase-catalyzed polymerization of α -D-glucose-1-phosphate into amylose chains (Figure 3) [87–89]. This approach was expected to be more effective than the direct coupling between two polysaccharides for the production of new covalent hybrids.

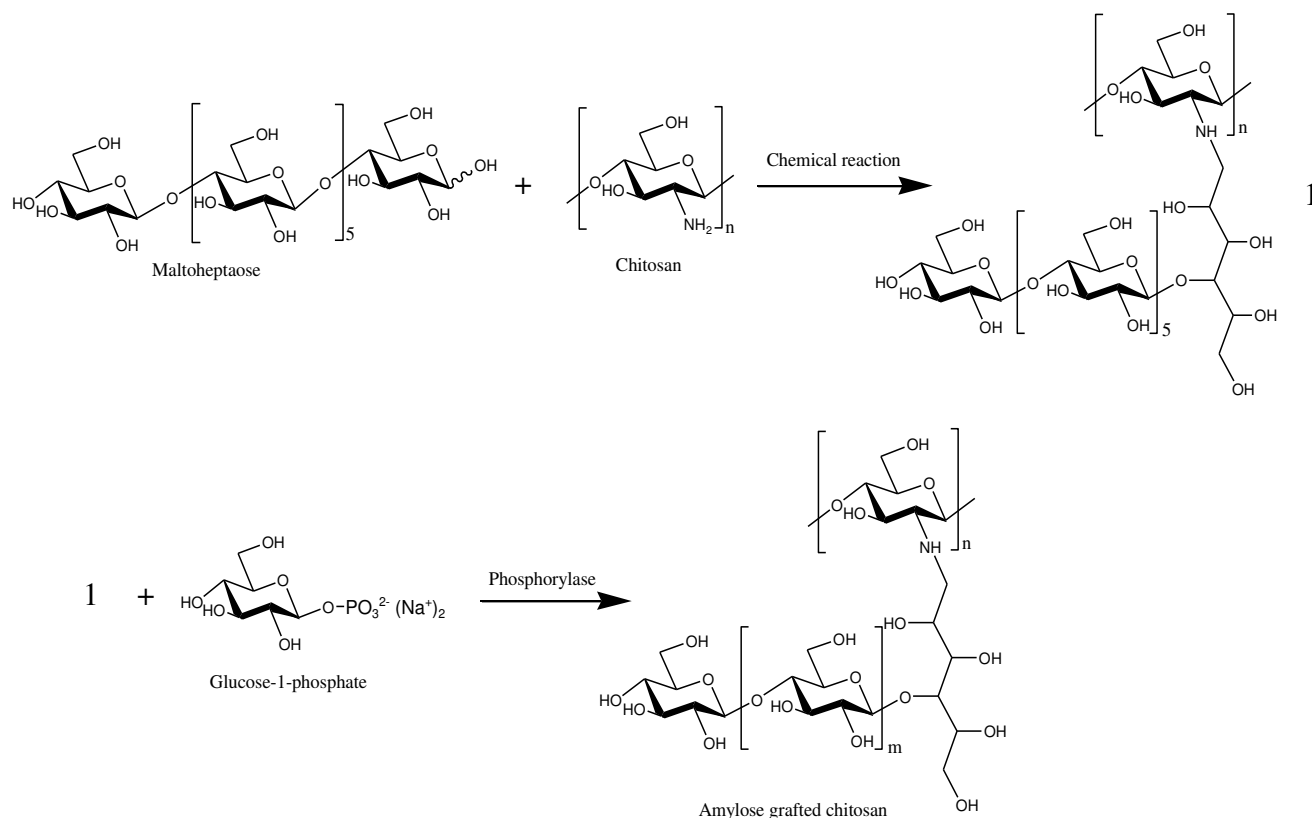


Figure 3: Chemo-enzymatic synthesis of amylose-grafted chitosan

III. Cellulose

Cellulose is a linear polymer made of glucan chains that result from the repetition of two anhydroglucose rings joined together via a β -(1 $\rightarrow$ 4) linkage [90]. The most commercially exploited natural resource containing cellulose is wood [91]. Besides that, other sources of cellulose such as plants [92], bacteria [3,93], tunicates [94,95] and algae (green, gray, red, yellow-green) [96] can be mentioned.

Cellulose is a liquid crystalline (LC) that is characterized by a high strength and flexibility, biocompatibility, non-toxicity and biodegradability. The numerous hydroxyl groups present on its structure lead to the formation of a dense hydrogen bond network that makes it a relatively stable polymer [97]. Cellulose ethers and cellulose esters are two main groups of cellulose derivatives that present various physicochemical and mechanical properties [98]. As well as for chitosan, enzymatic modification of cellulose has been fully addressed in the

literature aiming to produce new derivatives with improved properties. Hydroxyl groups of cellulose constitute the reactive sites targeted by enzymes in such bioprocesses.

III.1 Applications

Cellulose is the most structural component in herbal cells and tissues. In addition, it plays an important role in human food cycle indirectly. This polymer has multiple uses in many industries such as veterinary foods, cosmetics, pharmaceuticals as shown in Table 2.

Table 2: Main applications of cellulose and its derivatives

Domain	Properties and applications of cellulose	References
Foods	Thicken gums and sauces, stabilize oil/ water emulsions	
	Stabilize gas bubbles in whipped coatings with its film forming and surfactant properties	[99]
	Non-caloric bulking agent and binder in prepared foods	
	Prevent ice crystal growth in frozen foods	
Healthcare products	Compression tablets, syrups, granules, semisolid preparation, transdermal patches	[98,100]
Pharmaceutics	Osmotic and enteric coated drug delivery systems	[101]
	Bioadhesive formulations (buccal, nasal, transdermal, vaginal...)	[102]
	Drugs and liposomal formulations	[103]

III.2 Enzymatic modifications

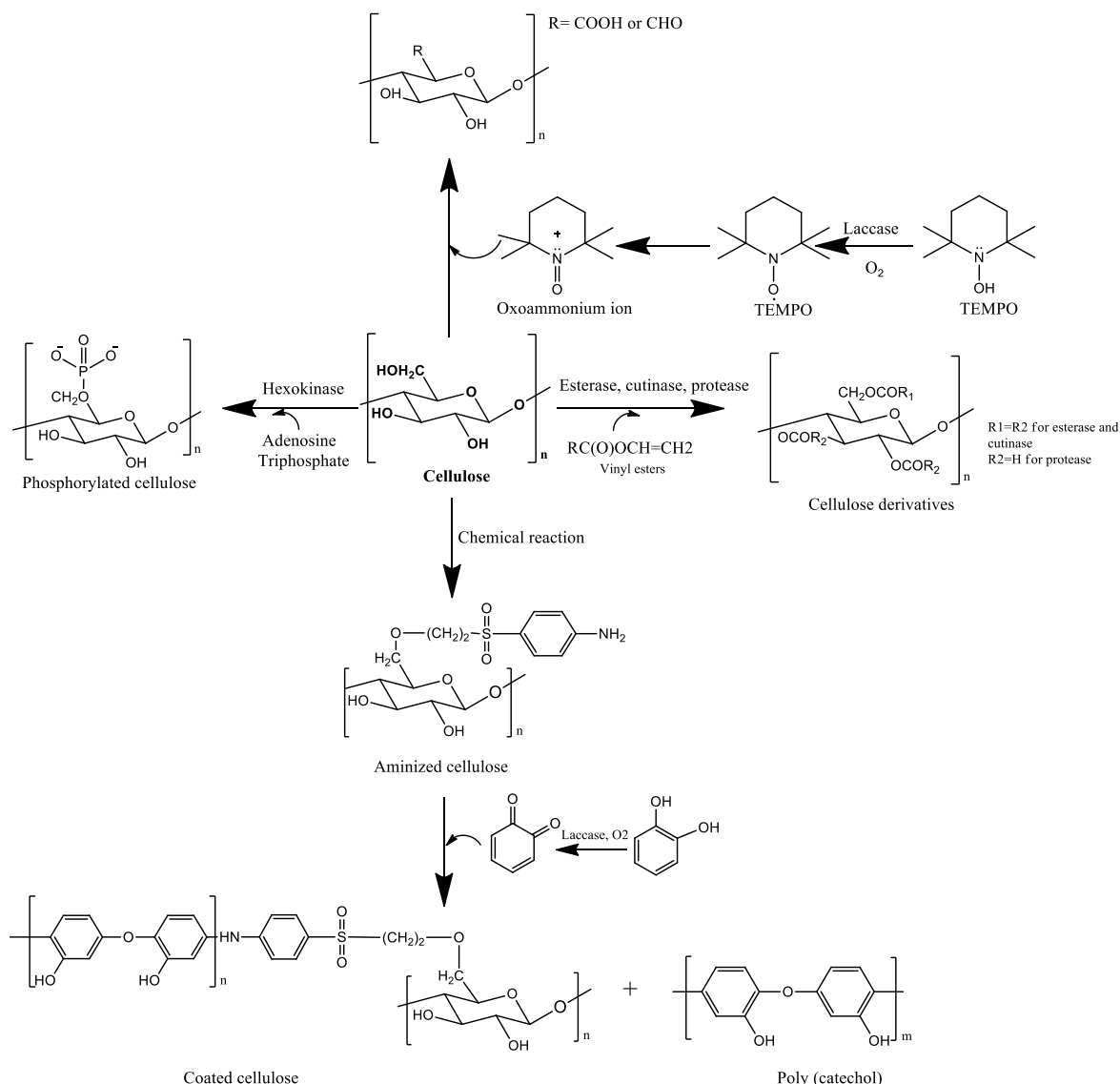


Figure 4: Different ways for the enzymatic modification of cellulose

TEMPO: 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl

III.2.1 Oxido-reduction

In order to improve paper strength and thus to add value to the utilization of cellulosic fibers in pulp and paper industry, a chemo-enzymatic approach using laccase and TEMPO (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl radical) was applied to modify cellulose structure. The introduction of carboxyl and aldehyde groups onto cellulosic fibers was performed in the presence of the laccase of *Trametes villosa* [104] or *Aspergillus oryzae* [105], in aqueous

medium, at pH 5 and room temperature. TEMPO was used as a mediator to form reactive laccase-mediator systems (LMS) [106]. In the presence of laccase and oxygen, TEMPO is oxidized to form oxoammonium ion. Subsequently, cellulosic fibers in turn become oxidized. Then, the laccase restores TEMPO back to the normal radical form and the oxidation cycle starts again. Results showed that enzymatic treatment of pulp increased its water retention capacity due to higher hydrophilicity.

- Grafting of phenolic compounds on cellulose

Several studies reported the grafting of phenolic compounds onto cellulose chains aiming to provide new properties. This approach was applied by Elegir et al., (2008) who developed an antimicrobial cellulose for food packaging. Two bioactive phenolic compounds known for their antimicrobial activity were grafted onto lignocellulose fibers using the laccase from *Trametes pubescens*. Caffeic acid and isoeugenol firstly reacted in the presence of laccase leading to phenolic oligomers that further coupled with lignocellulose. The antimicrobial activity of fibers treated with laccase-catalyzed bioprocess was higher than that of fibers treated with monomeric phenols [107]. Similar modifications were applied to cellulose fibers aiming to improve their hydrophobicity and to favor the internal sizing of paper during the papermaking process. An enzymatic reaction using the laccase from *Trametes villosa* was performed to graft lauryl gallate onto cellulose fibers in suspension. The treatment led to internal sizing of paper and reduced water penetration [108,109].

By extension, fibers rich in cellulose can be treated by similar bioprocesses. Unbleached flax fibers and sisal pulp were treated with two laccases (*Pycnoporus cinnabarinus* and *Trametes villosa*, respectively) in the presence of low molecular weight phenols (syringaldehyde, acetosyringone, and p-coumaric acid in the case of flax pulp and coniferaldehyde, sinapaldehyde, ferulic acid and sinapic acid in the case of sisal pulp) [110,111]. The antimicrobial activity of grafted fibers against bacteria like *Staphylococcus*

aureus, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [112] was higher than that of native fibers showing the interest of enzymatic treatment. Some authors reported that coupling between cellulose and phenols can be improved through chemical pretreatment of cellulose. In a first step, cellulose fibers were aminized. In a second step, fibers were coupled with phenolic oligomers produced by oxidation and polymerization of catechol in the presence of the laccase from *Trametes villosa* (Figure 4). On a mechanism viewpoint, laccase catalyzed the oxidation of catechol into quinone and oligomers that reacted with amino groups previously introduced on cellulose structure [113].

III.2.2 Acylation / esterification

The acylation of cellulose aimed to increase its hydrophobicity mainly by adding fatty acid chains. Such modification has often been used to synthesize surfactants or rheology modifiers. The chemical way is usually used but more and more studies are conducted on the development of enzymatic bioprocesses.

Gremos and his collaborators studied the enzymatic acylation of cellulose with vinyl propionate, vinyl laurate and vinyl stearate in a solvent free reaction system. A pretreatment of cellulose into the ionic liquid BMIMCl (1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride) [114] or supercritical CO₂ [115] was necessary to unwrap the polysaccharide and thus making it accessible to the enzyme. Immobilized esterase from hog liver and immobilized cutinase *Fusarium solani pisi* were capable of catalyzing this acylation reaction in contrast with four common lipases (immobilized *Candida antarctica* lipase B, *Candida cylindracea* lipase, *Aspergillus niger* lipase) that could not esterify the cellulosic substrate. As a result of this enzymatic reaction, various esters of cellulose were synthesized [114,115]. The properties of such fibers were studied. Results indicated that the degree of acylation allowed controlling the moisture absorption properties of fibers [116]. Similar reactions were performed in anhydrous pyridine, in the presence of Subtilisin Carsberg. The authors showed that the reaction was regioselective and took place on the primary hydroxyl group of cellulose [117–119].

The same approach can be applied to acetylate solid carboxymethyl cellulose (CMC) in aqueous solution or solubilized CMC in organic solvents, using vinyl acetate and the lipase of *Aspergillus niger*. The extent of acetylation was much higher in organic medium than in aqueous solution, probably due to the limiting effect of water on the reaction equilibrium and to a better accessibility of solubilized cellulose comparing with solid cellulose [120–122]. In addition to these works, many studies were conducted on the enzymatic acylation of hydroxyethyl cellulose (HEC). This water-soluble polymer was acylated using vinyl acetate and the lipase of *Pseudomonas cepacia* in N,N-dimethylacetamide (DMAc) (Figure 5). As a result, the acetylation of HEC was shown to decrease its solubility in water as well as its water retention capacity. A similar reaction was conducted with vinyl acrylate and the lipase from *Pseudomonas cepacia* or the protease from *Bacillus licheniformis*. Acylated HEC was shown to form a strong cross-linked gel in dimethylacetamide (DMAc) upon heating to 80 °C [123]. In another study, the viscosity of HEC was improved by grafting stearic chains in the presence of the lipase of *Pseudomonas cepacia* (Figure 5). The authors observed that the rate of the reaction could be increased by applying reduce pressure due to the elimination of the by-product, methanol [124].

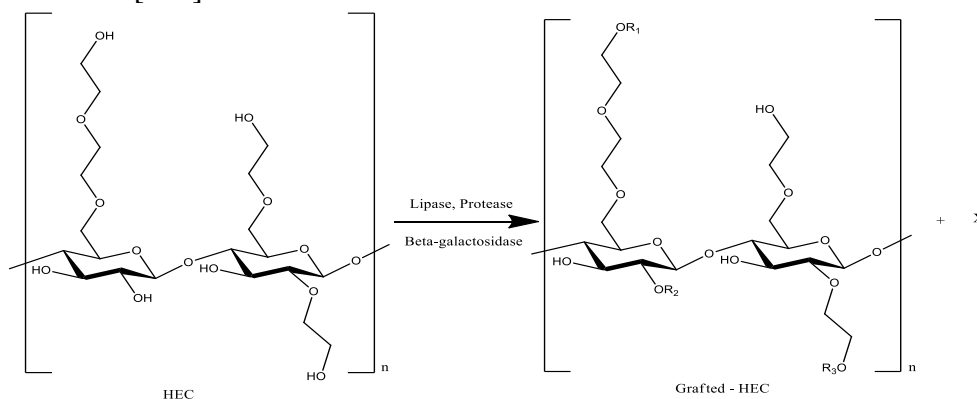


Figure 5: Enzymatic synthesis of acylated hydroxyethylcellulose (HEC)

The grafting of various acyl donors on HEC in the presence of lipase and/or protease was regioselective and happened at different locations. Depending on the selectivity of the enzyme three possibilities were reported:

- a- R1= stearate, alkyl ketene dimers (AKD), polycaprolactone; R2= R3= H [123,125]
- b- R1=R3= succinate; R2= H [126]
- c- R1=R2= acrylate, acetate; R3= H [123]

In the case of galactosidase, R1=R2=H; R3=glucose entity [123,127]

Due to the versatile character of lipases, other types of reaction can be performed to modify the structure, and then the properties of HEC. Di-acids like succinic acid were grafted using anhydride species in the presence of *Pseudomonas cepacia* lipase, in DMA_c (Figure 5) [126]. Other substrates like alkyl ketene dimers (AKD) can also be used to produce hydrophobic forms of HEC in the presence of a lipase (e.g. *Pseudomonas fluorescens* lipase) (Figure 5). HEC derivatives exhibited interesting rheological, surface-active properties, a higher viscosity than that of native HEC and the ability to complex with metal ions.

III.2.3 Copolymerization

The copolymerization is a process of reacting co-monomers that contain at least two different repeating units, together in a chemical reaction, to form polymer chains with new and controlled properties such as solubility, polarity, and hydrophilic/hydrophobic balance [39].

Cellulose-based branched polymers were prepared by incubating HEC [128] or cellulose acetate and butyrate [125] with ϵ -caprolactone, in the presence of the porcine pancreatic lipase or the lipase from *Pseudomonas cepacia*. These enzymes catalyzed the ring-opening of ϵ -caprolactone and its polymerization onto HEC film after being incubated at 60 °C, for 3–5 days, then bringing new properties such as spatiotemporally stable and biodegradable materials.

A cellulose-grafted amylose was synthesized by a chemo-enzymatic approach. Amylose is known to be synthesized by enzymatic polymerization of α -D-glucose-1-phosphate, catalyzed by phosphorylase. After chemical introduction of amino groups then grafting of maltoheptaose units onto cellulose, phosphorylase catalyzed an enzymatic polymerization in a similar approach to that described for chitosan, to create gels and films (Figure 3) [129,130].

III.2.4 Phosphorylation

Hexokinase enzymes (EC 2.7.1.1.) catalyze phosphoryl transfer from adenosine-5-triphosphate (ATP) to the primary 6-hydroxyl group of furanose and pyranose compounds. The ability of hexokinase to initiate the transfer of phosphate groups suggested the possibility to use

this enzyme to modify cellulose structure. Recently, cotton cellulose was phosphorylated on its primary hydroxyl group using a hexokinase from baker's yeast and ATP as phosphoryl donor, giving a highly reactive polymer toward various chemical compounds and thus profiting from its high ion exchange capacity [131]. For example, cellulose phosphates were used in the treatment of calcium metabolism-related diseases because of their ability to bind calcium ions [132]. Moreover, the phosphorylation of cellulose was found to enhance dye ability and flame resistance.

III.2.5 Glycosylation

Glycosylation is the reaction in which a glycosyl donor is attached to a hydroxyl or other functional group of another molecule called the glycosyl acceptor.

Lactose and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli* were used to graft galactose onto HEC in sodium acetate buffer, at ambient temperature, for 16 h. The enzyme catalyzed the transfer of galactose moiety to the hydroxyl group of HEC while glucose was discarded. The galactose residues were randomly grafted on all available OH groups of HEC. Moreover, the 6-hydroxyl of galactose can then be oxidized to an aldehyde using a galactose oxidase in a subsequent reaction [123,127,133].

IV. Pectin

Pectin is a complex anionic polysaccharide contained in plant primary cell walls. Pectin is a linear polysaccharide, composed of poly α -1,4-galacturonic acid units (approximately 70%), interrupted by L-rhamnose residues with side-chains constituted of neutral sugars, mainly L-rhamnose, L-arabinose and D-galactose [134]. The pectin network in plant cell walls is primarily constructed from rhamnogalacturonan (RG)-I and homogalacturonan (HG) regions that are often described as the "hairy" and the "smooth" regions, respectively. The hydroxyl and carboxyl functions of pectin are functional groups that can be targeted for enzymatic functionalization. Pectin is commercially extracted from citrus peels, apple pomace [135], sugar

beet waste, sunflower heads, and mango waste [136]. The polymer is water soluble and exhibits a viscosity and a gelation capacity that depend on its structure [137]. For example, pectin forms a gel at low pH when the ionization of the carboxylate groups is suppressed [138]. This property is strongly linked to the degree of esterification of galacturonic acid units, the molecular weight, the charge density, the ionic strength, the pH and the presence of other solutes (e.g. sugar) [139,140]. In fact, pectin with low degree of methylation forms gels in the presence of multivalent ions (usually calcium) whereas highly methylated pectin forms gel in acidic conditions with the addition of different sugars, e.g., sucrose or glucose [141].

IV.1 Applications

Pectin has health benefits and thus applications in regulated non-food segment as well as in functional foods, and in many fields such as environmental and pharmaceutical domains (Table 3).

Table 3: Potential applications of pectin

Domain	Properties and applications	References
Food	Gelling and thickening agent and stabilizer	[99]
Biomedical	Wound healing preparations and medical adhesives such as colostomy devices and implantable and prosthetic devices	[137]
	Lowering cholesterol	[135]
	Inhibiting lipid oxidation	[142]
	Reducing cancer and metastasis	[143]
	Stimulating the immune response	[144]
Environmental	Raw material for the production of edible and biodegradable films, adhesives, paper substitutes, foams and plasticizers	[145]
Pharmaceutical	Carrier for targeted drug delivery	[146]

IV.2 Enzymatic modifications

Enzymatic functionalization of pectin has been performed aiming to modify its properties and thus to expand its role in many domains of applications.

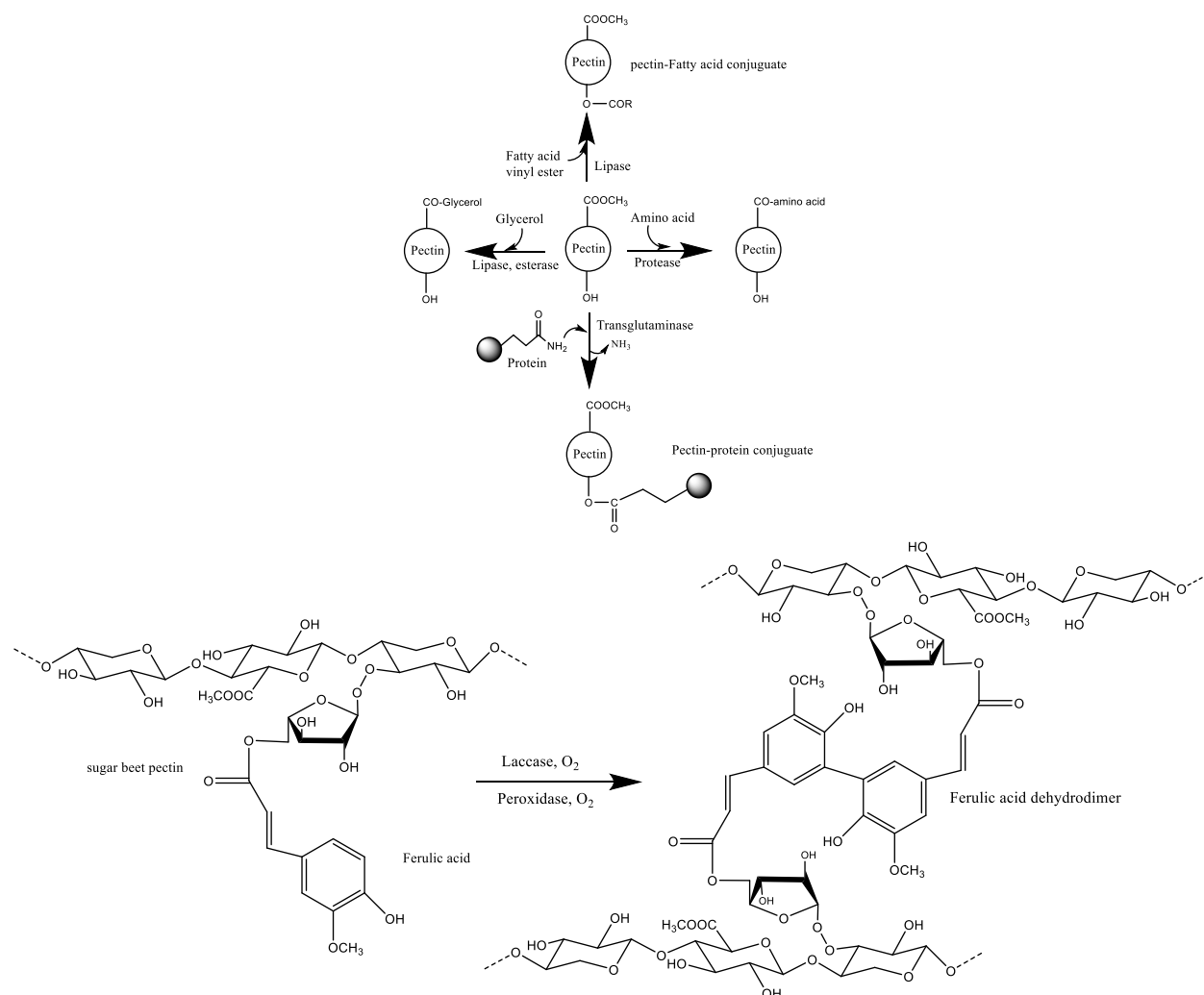


Figure 6: Enzymatic modifications of pectin

IV.2.1 Oxido-reduction

Concerning pectin, oxido-reduction reactions involve in the copolymerization of two polymers or the grafting of unusual substrates such as amino acids.

- Grafting of phenols onto pectin

Several studies described the grafting of phenols onto sugar beet pectin (SBP) aiming to improve its properties with respect to both gel-formation and emulsion stabilization. SBP is naturally substituted with ferulic acid (FA), and thus this polymer (SBP) can be cross-linked

via an enzymatic oxidation reaction involving phenolic units [147,148]. Covalently conjugated SBP by laccase has increased functionality and improved emulsion stability. In another study, HRP and laccase catalyzed the cross-linking of ferulic acid moieties (FA) in sugar beet pectin in the presence of H₂O₂ and O₂ respectively, in various conditions of pH, temperature and concentration [149]. Gels obtained from laccase-catalyzed gelation of pectin appeared to be stronger than those produced with HRP. The gelation rates seem to increase with temperature, substrate concentration and enzyme quantity. Chemical analysis confirmed the formation of ferulic acid dehydrodimers (diFAs) with both enzymes, supporting that the gelation resulted from oxidative cross-linking of FAs.

- **Grafting of protein onto pectin**

The crosslinking between soy protein and citrus pectin components was catalyzed by the *Streptovercillium* transglutaminase Ca²⁺-independent, leading to film-forming solutions. This reaction provoked different associations that could explain the less solid-like behavior of cross-linked films with respect to the ones prepared without the enzyme [150]. Pectin/soy flour films exhibited lower permeability to oxygen and carbon dioxide than that of polyethylene films. Moreover, these films presented a smooth surface and a high homogeneity [151].

In another study, the laccase of *Rhus vernicifera* was used to catalyze the hetero- and homo-covalent conjugation between ferulic acid units contained in SBP and tyrosine in heated Beta-lactoglobulin (BLG) (whey protein). As a result, heated BLG–SBP conjugates had improved water solubility at pH values close to the isoelectric point of BLG (PI~pH 5.1) [152]. More recently, Jung et al. proved that the conformation of BLG changes to more random coil when treated with laccase. An increased molecular weight (Mw) (attributed to entrapment of BLG in SBP cross-linked matrix catalyzed by laccase) and decreased ferulic acid content in SBP were observed in the presence of BLG and laccase [153].

Another study reported the grafting of amino acids onto high methylated pectin, using protease or papain. These enzymes catalyzed the aminolysis reaction between amino groups and pectin methyl ester groups, leading to gels [154].

Papain had a broad substrate specificity (all amino acids and some amines); however the gelling capacity of the polymer varied with the amino acid used. Indeed, it was noted that basic amino acids like lysine and arginine led to the best gels whereas aromatic or polar ones provided cloudy liquids [155].

IV.2.2 Acylation / esterification

Enzymatic acylation of pectin was performed, aiming to produce amphiphilic polysaccharide working as polymeric surfactants. The properties of native pectin like gelling and film forming capacity were maintained, while new properties such as decreased water solubility and film water vapor permeability were acquired.

A study described the grafting of glycerol onto pectin under mild conditions through enzymatic esterification. In this work, a wide range of lipases and esterases was screened. By the use of porcine pancreatic lipase (PPL) or *Candida rugosa* lipase, a glycerol-pectin adduct was produced, in which the carbon (C1) of the glycerol moiety formed a monoester with the primary 6-hydroxyl of pectin [123].

The lipase from *Candida Antarctica* was used to catalyze the synthesis of pectin fatty acid esters, in organic solvents or in solvent-free media. Lambertus et al. (2013) studied the esterification of apple pectin (75% methylated) with vinyl laurate using the lipase B from *Candida Antarctica* in supercritical CO₂ at 300 bars and 100°C for 96 h. As a comparison, the reaction was also performed with apple pectin and beet pectin in *t*-butanol as a solvent. As a result, the degree of substitution (DS) estimated from infrared analyses was higher in *t*-butanol (DS around 0.29) than that obtained in scCO₂ (DS around 0.14) [156]. The reaction was perfectly regioselective, leading to the acylation of the primary 6-hydroxyl of pectin.

V. Starch

Starch is a polymer consisting of α -D-glucose units [157]. It is composed of 20-30% amylose and 70-80% amylopectin [158–160]. Starch is one of the most abundant biopolymers in the nature and present in living plants (wheat, rice, maize, tapioca, and potato) as energy storage material [161]. It is biocompatible, biodegradable, nontoxic, low-cost and renewable [162,163]. In addition, starch is insoluble in cold water, but it is very hygroscopic and binds water reversibly [164].

V.1 Applications

Commercial production of starch for food and other industrial fields was initiated years ago. Native and modified starch are both used to stabilize frozen food and to encapsulate flavor in dairy products [165,166]. They are also used in non-food applications such as paper and textile industries, pharmaceuticals and drug delivery systems [167–169].

V.2 Enzymatic modifications

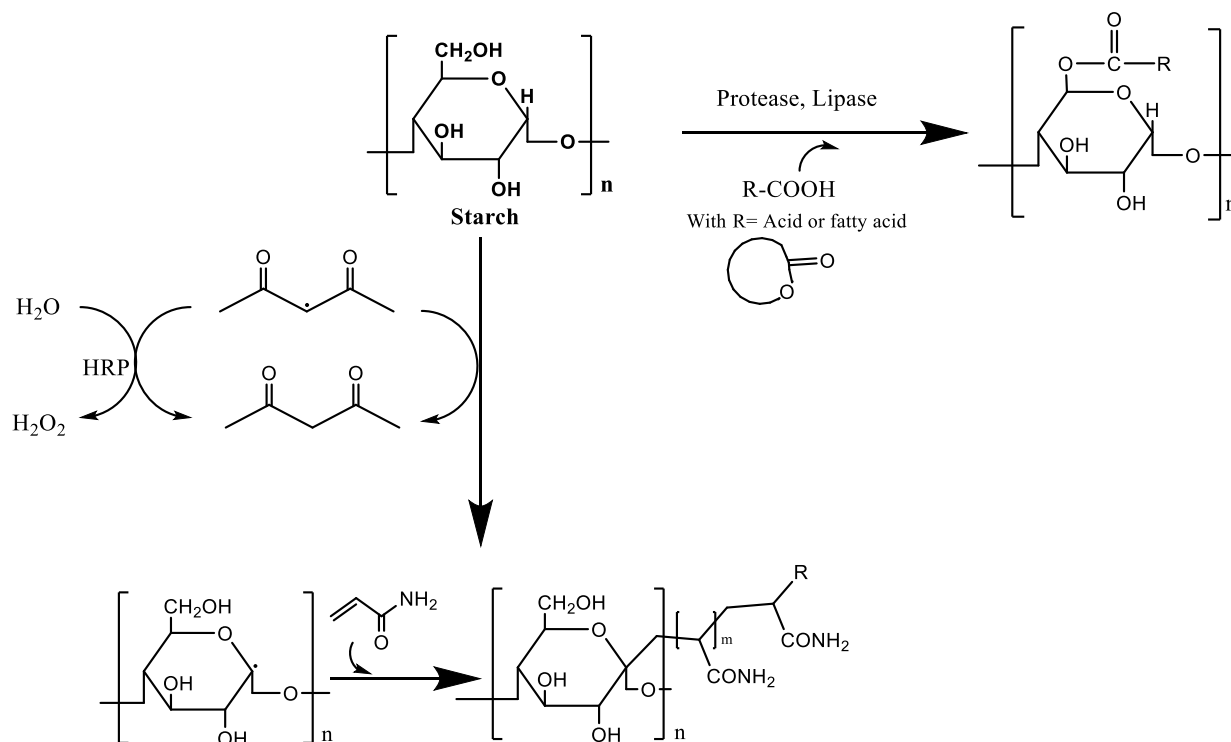


Figure 7: Enzymatic modifications of starch

V.2.1 Acylation / esterification

In order to reduce the digestibility and the viscosity of starch, and to increase its hydrophobicity, enzymatic acylation reactions can be performed. Rajan and his collaborators studied the enzymatic esterification of cassava and maize starch with fatty acids recovered from coconut oil, using *Thermomyces lanuginosus* lipase [170], fungal lipase [171] or bacterial lipase [172]. The reactions were performed in organic solvents, under microwave radiation. Results showed that starch was acylated on its primary OH groups, leading to a more hydrophobic thermoplastic with wide uses in plastic industry, pharmaceutical industries, as carrier for targeted drug delivery systems, and in biomedical applications such as materials for bone fixation and replacement.

Starch nanoparticles in microemulsions reacted with vinyl stearate, ϵ -caprolactone, and maleic anhydride in the presence of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) in its immobilized or free forms, at 40 °C, for 48 h. Substitution occurred regioselectively on the primary 6-hydroxyl group of the glucose repeat units. This selective esterification led to starch esters with various degrees of substitution that could be used in pharmaceuticals, cosmetics, glues and adhesives, medicines (for example delivery of insulin via the nasal system), and many more in the non-food sector [173].

Alissandratos et al. proved that lipase-catalyzed acylation of starch is feasible in aqueous gel systems. They reported the enzymatic esterification of different starches with decanoic acid using *Thermomyces lanuginosus* lipase, at 50 °C for 60 minutes. Transesterification between methyl decanoate and the primary 6-OH group of glucose entities was observed [174].

In order to improve the hydrophobicity of native starch but also to bring new properties to the polymer, starch was acylated with rosin acid, in the presence of the CALB [175]. Rosin acid is natural product obtained from the exudation of conifers. It is a mixture consisting primarily of abietic acid, levopimaric acid, and pimaric acid [176]. Enzymatic synthesis of

rosin acid starch was carried out under mild conditions. And the esterified starch exhibited higher viscosity, a good emulsifying properties and a decreased in its swelling power, solubility and transparency in water [177].

Candida rugosa lipase was used for the synthesis of long-chain fatty acid starch esters (starch-laurate), using ionic liquid as solvent. The morphological and crystallographic characteristics of native starch were largely disordered during the process. As a result, the thermal stability of starch-laurate was found to be lower than that of native starch [178]. Earlier, a lipase was also used to acylate the corn starch with palmitic acid in a solvent-free system. The introduction of palmitic acid into starch rendered it more hydrophobic. The starch was expected to acquire emulsifier properties [179].

Proteases were also used to catalyze this kind of reactions. The enzymatic acylation of starch was performed with n-capric acid vinyl ester and the subtilisin from *Bacillus licheniformis*, in isooctane (Figure 7). As a result, amylose was regioselectively acylated on its primary hydroxyl groups in spite of its low solubility in the solvent [180–182].

V.2.2 Copolymerization

Co-polymers with specific structure and properties can be obtained by coupling starch with another polymer. Shogren and coworkers reported the synthesis of grafted starch exhibiting high water absorption capacity that could be used as additive in papermaking or textile sizing. Acrylamide was coupled with starch using HRP in the presence of H₂O₂ and pentanediol (PDO) in water and acetate buffer (pH 7), at a temperature of 30 °C. In this reaction, PDO was oxidized to a free radical, which then takes a proton from starch to give carbonyl radicals that serve as macro initiators for the copolymerization of acrylic monomers. The authors suggested that the poly(acrylamide) chain was covalently attached of to the starch backbone *via* the abstraction of glycosidic hydrogen atoms (Figure 7) [183,184].

Graft copolymerization of waxy maize starch and sodium lignosulfonate (SLS) was catalyzed by *Trametes versicolor* laccase in aqueous solution. Starch-SLS graft copolymer had a good antioxidant activity consistent with its phenolic content. This copolymer constitutes a promising material for many applications in the fields of food additives, cosmetics and packaging [185].

VI. Conclusion

Environmental requirements are today becoming of great importance in our society. In this context, there is an increased interest in the industrial use of renewable resources such as starch, chitosan, cellulose, and pectin. The growing interest in these macromolecules is evident from the number of papers that appear each year in the literature on this topic. Efforts are made in the research and the development of polysaccharide derivatives as basic materials for new applications based on new and/or improved properties of these biopolymers. Enzymatic processes offer innovative solutions that exploit the specificity and selectivity properties of enzymes to specifically modify macromolecular structures in order to control polymer functions.

In this review, enzymatic reactions such as amidation, oxidation and acylation appear to be the most relevant ways to change the properties of polysaccharides. Polyphenol-oxidases, lipases and transglutaminases were mainly used to catalyze these reactions. Functionalization mechanisms of polysaccharides were highlighted, showing that primary amino and hydroxyl groups were involved. Physicochemical characteristics such as solubility, rheological behavior, antioxidant activities and biological properties such as cell adhesion, antimicrobial activity could be improved by enzymatic functionalization. Furthermore, the chemo-enzymatic approach was also reported as a good and reliable method for functionalizing biopolymers, since it combines the efficiency of chemical methods with the specificity and selectivity of enzymatic processes. To further develop this topic, systematic studies on structure-properties

relationships have to be carried out in order to identify the molecular patterns of interest and the best way for their synthesis.

VII. Références

- [1] V.R. Sinha, R. Kumria, Polysaccharides in colon-specific drug delivery, *Int. J. Pharm.* 224 (2001) 19–38.
- [2] S. Kalia, L. Avérous, *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*, John Wiley & Sons, 2011.
- [3] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 3358–3393.
- [4] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 641–678.
- [5] K. Reddy, G.K. Mohan, S. Satla, S. Gaikwad, Natural polysaccharides: versatile excipients for controlled drug delivery systems, *J Pharm Sci.* 6 (2011) 275–286.
- [6] M. Tizzotti, A. Charlot, E. Fleury, M. Stenzel, J. Bernard, Modification of Polysaccharides Through Controlled/Living Radical Polymerization Grafting—Towards the Generation of High Performance Hybrids, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 1751–1772.
- [7] G. Crini, Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment, *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 38–70.
- [8] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1650–1662.
- [9] J.-S. Yang, Y.-J. Xie, W. He, Research progress on chemical modification of alginate: A review, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 33–39.
- [10] G.G. d’Ayala, M. Malinconico, P. Laurienzo, Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches, *Mol. Basel Switz.* 13 (2008) 2069–2106.
- [11] G.A. Vikhoreva, I.N. Gorbacheva, L.S. Gal’braikh, Chemical modification of aquatic polysaccharides. A review, *Fibre Chem.* 26 (1994) 326–334.

- [12] B.V. McCleary, Enzymatic modification of plant polysaccharides, *Int. J. Biol. Macromol.* 8 (1986) 349–354.
- [13] Q.-M. Gu, H.N. Cheng, Enzyme-Catalyzed Condensation Reactions for Polymer Modifications, in: H.N. Cheng, R.A. Gross (Eds.), *Polym. Biocatal. Biomater.*, American Chemical Society, Washington, DC, 2005: pp. 427–436.
- [14] A.G. Cunha, A. Gandini, Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates, *Cellulose*. 17 (2010) 1045–1065.
- [15] G.M. Gübitz, A.C. Paulo, New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 577–582.
- [16] R.N. Tharanathan, F.S. Kittur, Chitin--the undisputed biomolecule of great potential, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43 (2003) 61–87.
- [17] P. Pochanavanich, W. Suntornsuk, Fungal chitosan production and its characterization, *Lett. Appl. Microbiol.* 35 (2002) 17–21.
- [18] K.P. Kannan, T.S. George, K.S.S. Guru, N.S. Vasanthi, Extraction, purification and characterization of chitosan from endophytic fungi isolated from medicinal plants, *World J. Sci. Technol.* 1 (2011).
- [19] J.-H. Pa, T.L. Yu, Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions, *Macromol. Chem. Phys.* 202 (2001) 985–991.
- [20] R. Hejazi, M. Amiji, Chitosan-based gastrointestinal delivery systems, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 89 (2003) 151–165.
- [21] M. Terbojevich, R.A.A. Muzzarelli, Chitosan. In G. Phillips and P. Williams, eds., *Handbook of Hydrocolloids.*, in: Woodhead, Cambridge, UK., 2000: pp. p. 367–378.
- [22] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *Int. J. Food Microbiol.* 144 (2010) 51–63.
- [23] A. Peña, N.S. Sánchez, M. Calahorra, Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity, *BioMed Res. Int.* 2013 (2013) 15 pages.

- [24] I. Bravo-Osuna, G. Millotti, C. Vauthier, G. Ponchel, In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 284–290.
- [25] F.-H. Liao, M.-J. Shieh, N.-C. Chang, Y.-W. Chien, Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients, *Nutr. Res.* 27 (2007) 146–151.
- [26] C.-Y. Chen, Y.-C. Chung, Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*, *J. Appl. Oral Sci.* 20 (2012) 620–627.
- [27] F. Shahidi, R. Abuzaytoun, Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects, *Adv. Food Nutr. Res.* 49 (2005) 93–135.
- [28] J.H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I.C. Kwon, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 28–41.
- [29] V. Jarmila, E. Vavříková, Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities--a review, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 3596–3607.
- [30] J. Liu, J. Zhang, W. Xia, Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo, *Food Chem.* 107 (2008) 419–425.
- [31] A.K. Azad, N. Sermsintham, S. Chandkrachang, W.F. Stevens, Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 69 (2004) 216–222.
- [32] C.E. Orrego, N. Salgado, J.S. Valencia, G.I. Giraldo, O.H. Giraldo, C.A. Cardona, Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 9–16.
- [33] C. Clasen, T. Wilhelms, W.-M. Kulicke, Formation and Characterization of Chitosan Membranes, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 3210–3222.
- [34] M.G. Devi, J.J. Dumanan, S. Feroz, Dairy Wastewater Treatment Using Low Molecular Weight Crab Shell Chitosan, *J. Inst. Eng. India Ser. E.* 93 (2012) 9–14.
- [35] E.-G. Lizárraga-Paulín, S.-P. Miranda-Castro, E. Moreno-Martínez, A.-V. Lara-Sagahón, I. Torres-Pacheco, Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and

hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 14 (2013) 87–96.

[36] A. El Hadrami, L.R. Adam, I. El Hadrami, F. Daayf, Chitosan in Plant Protection, *Mar. Drugs.* 8 (2010) 968–987.

[37] V. Dodane, V.D. Vilivalam, Pharmaceutical applications of chitosan, *Pharm Sci Technol Today.* (1998) 1, 246–253.

[38] A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia, Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 112 (2015) 25–39.

[39] A.M. Parambil, Y.M. Puttaiahgowda, P. Shankarappa, Copolymerization of N-Vinyl pyrrolidone with methyl methacrylate by Ti (III)-DMG redox initiator, *Turk. J. Chem.* 36 (2012) 397–409.

[40] C.M. Aberg, T. Chen, G.F. Payne, Renewable Resources and Enzymatic Processes to Create Functional Polymers: Adapting Materials and Reactions from Food Processing, *J. Polym. Environ.* 10 (2002) 77–84.

[41] T. Chen, G. Kumar, M.T. Harris, P.J. Smith, G.F. Payne, Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 564–573.

[42] T. Chen, G. Kumar, M.T. Harris, P.J. Smith, G.F. Payne, Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 564–573.

[43] R. Jayakumar, M. Prabakaran, R.L. Reis, J.F. Mano, Graft copolymerized chitosan—present status and applications, *Carbohydr. Polym.* 62 (2005) 142–158.

[44] M.N. Clifford, Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products, in: M.N. Clifford, K.C. Willson (Eds.), *Coffee*, Springer US, 1985: pp. 305–374.

[45] Kumar, Smith, Payne, Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions, *Biotechnol. Bioeng.* 63 (1999) 154–165.

[46] L.-Q. Wu, T. Chen, K.K. Wallace, R. Vazquez-Duhalt, G.F. Payne, Enzymatic coupling of phenol vapors onto chitosan, *Biotechnol. Bioeng.* 76 (2001) 325–332.

- [47] F. Sousa, G.M. Guebitz, V. Kokol, Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids, *Process Biochem.* 44 (2009) 749–756.
- [48] L. Fras-Zemljic, V. Kokol, D. Cakara, Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids, *Text. Res. J.* 81 (2011) 1532–1540.
- [49] A. Chao, Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan—to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent, *Bioresour. Technol.* 91 (2004) 157–162.
- [50] Y. Liu, B. Zhang, V. Javvaji, E. Kim, M.E. Lee, S.R. Raghavan, et al., Tyrosinase-mediated grafting and crosslinking of natural phenols confers functional properties to chitosan, *Biochem. Eng. J.* 89 (2014) 21–27.
- [51] G. Kumar, J.F. Bristow, P.J. Smith, G.F. Payne, Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan, *Polymer.* 41 (2000) 2157–2168.
- [52] J. Vartiainen, M. Rättö, R. Lantto, K. Nättinen, E. Hurme, Tyrosinase-catalysed grafting of food-grade gallates to chitosan: surface properties of novel functional coatings, *Packag. Technol. Sci.* 21 (2008) 317–328.
- [53] L. Itzincab-Mejía, A. López-Luna, M. Gimeno, K. Shirai, E. Bárzana, Enzymatic grafting of gallate ester onto chitosan: evaluation of antioxidant and antibacterial activities, *Int. J. Food Sci. Technol.* 48 (2013) 2034–2041.
- [54] L. Zavaleta-Avejar, E. Bosquez-Molina, M. Gimeno, J.P. Pérez-Orozco, K. Shirai, Rheological and antioxidant power studies of enzymatically grafted chitosan with a hydrophobic alkyl side chain, *Food Hydrocoll.* 39 (2014) 113–119.
- [55] S. Sakai, Y. Yamada, T. Zenke, K. Kawakami, Novel chitosan derivative soluble at neutral pH and in-situ gellable via peroxidase-catalyzed enzymatic reaction, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 230.
- [56] N.T. Phuong, V.A. Ho, D.H. Nguyen, N.C. Khoa, T.N. Quyen, Y. Lee, et al., Enzyme-mediated fabrication of an oxidized chitosan hydrogel as a tissue sealant, *J. Bioact. Compat. Polym. Biomed. Appl.* (2015) 0883911515578760.
- [57] L. Vachoud, T. Chen, G.F. Payne, R. Vazquez-Duhalt, Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan, *Enzyme Microb. Technol.* 29 (2001) 380–385.

- [58] W. Pasanphan, G.R. Buettner, S. Chirachanchai, Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 132–140.
- [59] I. Brzonova, W. Steiner, A. Zankel, G.S. Nyanhongo, G.M. Guebitz, Enzymatic synthesis of catechol and hydroxyl-carboxylic acid functionalized chitosan microspheres for iron overload therapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 294–303.
- [60] A.V. Karamyshev, S.V. Shleev, O.V. Koroleva, A.I. Yaropolov, I.Y. Sakharov, Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 556–564.
- [61] A.M. Mayer, R.C. Staples, Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry.* 60 (2002) 551–565.
- [62] A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, C. Paris, J. Scher, L. Muniglia, Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: a green procedure for the synthesis of new compounds, *Food Chem.* 145 (2014) 1046–1054.
- [63] A. Aljawish, I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, et al., Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 537–544.
- [64] A. Aljawish, L. Muniglia, J. Jasniewski, A. Klouj, J. Scher, I. Chevalot, Adhesion and growth of HUVEC endothelial cells on films of enzymatically functionalized chitosan with phenolic compounds, *Process Biochem.* 49 (2014) 863–871.
- [65] J.L. García-Zamora, M. Sánchez-González, J.A. Lozano, J. Jáuregui, T. Zayas, V. Santacruz, et al., Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content, *Process Biochem.* 50 (2015) 125–133.
- [66] M. Božič, S. Gorgieva, V. Kokol, Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 2388–2398.
- [67] A. Anghileri, R. Lantto, K. Kruus, C. Arosio, G. Freddi, Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein–polysaccharide bioconjugates, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 508–519.

- [68] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, et al., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*. 24 (2003) 401–416.
- [69] S. Sampaio, P. Taddei, P. Monti, J. Buchert, G. Freddi, Enzymatic grafting of chitosan onto *Bombyx mori* silk fibroin: kinetic and IR vibrational studies, *J. Biotechnol.* 116 (2005) 21–33.
- [70] P. Monti, G. Freddi, S. Sampaio, M. Tsukada, P. Taddei, Structure modifications induced in silk fibroin by enzymatic treatments. A Raman study, *J. Mol. Struct.* 744-747 (2005) 685–690.
- [71] G. Freddi, A. Anghileri, S. Sampaio, J. Buchert, P. Monti, P. Taddei, Tyrosinase-catalyzed modification of *Bombyx mori* silk fibroin: grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions, *J. Biotechnol.* 125 (2006) 281–294.
- [72] P. Wang, M. Yu, L. Cui, J. Yuan, Q. Wang, X. Fan, Modification of *Bombyx mori* silk fabrics by tyrosinase-catalyzed grafting of chitosan, *Eng. Life Sci.* 14 (2014) 211–217.
- [73] C.M. Aberg, T. Chen, A. Olumide, S.R. Raghavan, G.F. Payne, Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysate to chitosan. Potential for value-added byproducts from food-processing wastes, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 788–793.
- [74] K. Yamada, T. Chen, G. Kumar, O. Vesnovsky, L.D. Topoleski, G.F. Payne, Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue, *Biomacromolecules*. 1 (2000) 252–258.
- [75] G. Rocasalbas, A. Francesko, S. Touriño, X. Fernández-Francos, G.M. Guebitz, T. Tzanov, Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 989–996.
- [76] T. Chen, H.D. Embree, E.M. Brown, M.M. Taylor, G.F. Payne, Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications, *Biomaterials*. 24 (2003) 2831–2841.
- [77] T. Chen, H.D. Embree, L.-Q. Wu, G.F. Payne, In vitro protein-polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan, *Biopolymers*. 64 (2002) 292–302.

- [78] M.A. da Silva, F. Bode, I. Grillo, C.A. Dreiss, Exploring the Kinetics of Gelation and Final Architecture of Enzymatically Cross-Linked Chitosan/Gelatin Gels, *Biomacromolecules*. 16 (2015) 1401–1409.
- [79] Y. Wang, Y. Wang, X. Guo, Y. Xiong, M. Guo, X. Wang, Microbial Transglutaminase and Tyrosinase Modified Gelatin-Chitosan Material, *Soft Mater*. 13 (2015) 32–38.
- [80] L.-Y. Sang, X.-H. Zhou, F. Yun, G.-L. Zhang, Enzymatic synthesis of chitosan-gelatin antimicrobial copolymer and its characterisation, *J. Sci. Food Agric*. 90 (2010) 58–64.
- [81] P. Di Pierro, B. Chico, R. Villalonga, L. Mariniello, P. Masi, R. Porta, Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan-ovalbumin films, *Enzyme Microb. Technol*. 40 (2007).
- [82] P. Di Pierro, B. Chico, R. Villalonga, L. Mariniello, A.E. Damiao, P. Masi, et al., Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 744–749.
- [83] L. Fan, H. Wu, X. Zhou, M. Peng, J. Tong, W. Xie, et al., Transglutaminase-catalyzed grafting collagen on chitosan and its characterization, *Carbohydr. Polym*. 105 (2014) 253–259.
- [84] L. Fan, H. Wu, M. Cao, X. Zhou, M. Peng, W. Xie, et al., Enzymatic synthesis of collagen peptide-carboxymethylated chitosan copolymer and its characterization, *React. Funct. Polym*. 76 (2014) 26–31.
- [85] M. Fujioka, H. Okada, Y. Kusaka, S. Nishiyama, H. Noguchi, S. Ishii, et al., Enzymatic Synthesis of Chitin- and Chitosan-graft-Aliphatic Polyesters, *Macromol. Rapid Commun*. 25 (2004) 1776–1780.
- [86] Q. Zeng, Y. Tian, C. Zhou, B. Luo, Enzymatic synthesis of chitosan-graft-poly(l-lactide) copolymers under single-mode microwave irradiation: enzymatic synthesis of chitosan-graft-poly(l-lactide) copolymers under single-mode microwave irradiation, *Acta Polym. Sin*. 012 (2012) 593–598.
- [87] J.-I. Kadokawa, Architecture of amylose supramolecules in form of inclusion complexes by phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization, *Biomolecules*. 3 (2013) 369–385.
- [88] J. Kadokawa, Y. Kaneko, *Advances in the Engineering of Polysaccharide Materials: by Phosphorylase-Catalyzed Enzymatic Chain-Elongation*, CRC Press, 2013.

- [89] Y. Kaneko, S. Matsuda, J. Kadokawa, Chemoenzymatic syntheses of amylose-grafted chitin and chitosan., *Biomacromolecules*. (2007) 3959–64.
- [90] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht, *Comprehensive cellulose chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
- [91] M.A. Hubbe, O.J. Rojas, L.A. Lucia, M. Sain, Cellulosic nanocomposites: a review, *BioResources*. 3 (2008) 929–980.
- [92] A. Alemdar, M. Sain, Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 1664–1671.
- [93] M. Iguchi, S. Yamanaka, A. Budhiono, Bacterial cellulose—a masterpiece of nature’s arts, *J. Mater. Sci.* 35 (2000) 261–270.
- [94] V. Favier, H. Chanzy, J.Y. Cavaille, Polymer Nanocomposites Reinforced by Cellulose Whiskers, *Macromolecules*. 28 (1995) 6365–6367.
- [95] O. van den Berg, J.R. Capadona, C. Weder, Preparation of homogeneous dispersions of tunicate cellulose whiskers in organic solvents, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 1353–1357.
- [96] T. Imai, J. Sugiyama, Nanodomains of I-alpha and I-beta cellulose in algal microfibrils, *Macromolecules*. 31 (1998) 6275–6279.
- [97] S.J. Eichhorn, G.R. Davies, Modeling cellulose polymorphs using molecular mechanics, 231st Natl. Meet. Am.-Chem.-Soc. GA Amer Chem. Soc 2006. (2006).
- [98] J. Shokri, K. Adibkia, Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries, in: T.G.M. Van De Ven (Ed.), *Cellul. - Med. Pharm. Electron. Appl.*, InTech, 2013.
- [99] D. Saha, S. Bhattacharya, Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, *J. Food Sci. Technol.* 47 (2010) 587–597.
- [100] K. Adibkia, M.R. Siah Shadbad, A. Nokhodchi, A. Javadzede, M. Barzegar-Jalali, J. Barar, et al., Piroxicam nanoparticles for ocular delivery: physicochemical characterization and implementation in endotoxin-induced uveitis, *J. Drug Target.* 15 (2007) 407–416.
- [101] P.N. Gupta, A. Pattani, R.M. Curran, V.L. Kett, G.P. Andrews, R.J. Morrow, et al., Development of liposome gel based formulations for intravaginal delivery of the recombinant

HIV-1 envelope protein CN54gp140, *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 46 (2012) 315–322.

[102] V. Grabovac, D. Guggi, A. Bernkop-Schnürch, Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1713–1723.

[103] M.C. Deshpande, V. Venkateswarlu, R.K. Babu, R.K. Trivedi, Design and evaluation of oral bioadhesive controlled release formulations of miglitol, intended for prolonged inhibition of intestinal α -glucosidases and enhancement of plasma glucagon like peptide-1 levels, *Int. J. Pharm.* 380 (2009) 16–24.

[104] E. Aracri, T. Vidal, Enhancing the effectiveness of a laccase–TEMPO treatment has a biorefining effect on sisal cellulose fibres, *Cellulose*. 19 (2012) 867–877.

[105] S. Xu, Z. Song, X. Qian, J. Shen, Introducing carboxyl and aldehyde groups to softwood-derived cellulosic fibers by laccase/TEMPO-catalyzed oxidation, *Cellulose*. 20 (2013) 2371–2378.

[106] I. Patel, R. Ludwig, D. Haltrich, T. Rosenau, A. Potthast, Studies of the chemoenzymatic modification of cellulosic pulps by the laccase-TEMPO system, *Holzforschung*. 65 (2011) 475–481.

[107] G. Elegir, A. Kindl, P. Sadocco, M. Orlandi, Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds, *Enzyme Microb. Technol.* 43 (2008) 84–92.

[108] J. Garcia-Ubasart, J.F. Colom, C. Vila, N.G. Hernández, M. Blanca Roncero, T. Vidal, A new procedure for the hydrophobization of cellulose fibre using laccase and a hydrophobic phenolic compound, *Bioresour. Technol.* 112 (2012) 341–344.

[109] O. Cusola, C. Valls, T. Vidal, M.B. Roncero, Application of surface enzyme treatments using laccase and a hydrophobic compound to paper-based media, *Bioresour. Technol.* 131 (2013) 521–526.

[110] E. Aracri, A. Fillat, J.F. Colom, A. Gutiérrez, J.C. del Río, Á.T. Martínez, et al., Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 8211–8216.

- [111] J. Rencoret, E. Aracri, A. Gutiérrez, J.C. del Río, A.L. Torres, T. Vidal, et al., Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers, *Biochem. Eng. J.* 86 (2014) 16–23.
- [112] A. Fillat, O. Gallardo, T. Vidal, F.I.J. Pastor, P. Díaz, M.B. Roncero, Enzymatic grafting of natural phenols to flax fibres: Development of antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 146–152.
- [113] S.Y. Kim, A. Zille, M. Murkovic, G. Güebitz, A. Cavaco-Paulo, Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1782–1787.
- [114] S. Gremos, D. Zarafeta, D. Kekos, F. Kolisis, Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 1378–1382.
- [115] S. Gremos, D. kekos, F. kolisis, Supercritical carbon dioxide biocatalysis as a novel and green methodology for the enzymatic acylation of fibrous cellulose in one step, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 96–101.
- [116] A.K. Bledzki, A.A. Mamun, M. Lucka-Gabor, V.. Gutowski, The effects of acetylation on properties of flax fibre and its polypropylene composites, *Express Polym. Lett.* 2 (2008) 413–422.
- [117] G.M. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 577–582.
- [118] J. Xie, Y.-L. Hsieh, Enzyme-catalyzed transesterification of vinyl esters on cellulose solids, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 39 (2001) 1931–1939.
- [119] J. Xie, Y.-L. Hsieh, Modification of Cellulose Solids by Enzyme-Catalyzed Transesterification with Vinyl Esters in Anhydrous Organic Solvents, in: *Biocatal. Polym. Sci.*, American Chemical Society, 2003: pp. 217–230.
- [120] K. Yang, Y.-J. Wang, M.-I. Kuo, Effects of Substrate Pretreatment and Water Activity on Lipase-Catalyzed Cellulose Acetylation in Organic Media, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1053–1061.
- [121] K. Yang, Y.J. Wang, Lipase-catalyzed cellulose acetylation in aqueous and organic media, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1664–1671.

- [122] K. Yang, Y.J. Wang, Lipase-catalyzed transesterification in aqueous medium under thermodynamic and kinetic control using carboxymethyl cellulose acetylation as the model reaction, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 223–231.
- [123] H.N. Cheng, Q.-M. Gu, Enzyme-Catalyzed Modifications of Polysaccharides and Poly(ethylene glycol), *Polymers*. 4 (2012) 1311–1330.
- [124] Q.M. Gu, H.N. Cheng, Enzyme Catalyzed Esterification of Cellulosics Guar and Polyethers, in: *Polym. Prepr. -Am. CD-ROM Ed.- 46 1 30-31 Biol. Synth. Macromol. Emerg. Nanotechnologies Symp. Biol. Synth. Macromol. Emerg. Nanotechnologies*, 2005.
- [125] R. Kusumi, S.-H. Lee, Y. Teramoto, Y. Nishio, Cellulose Ester-graft-poly(epsilon-caprolactone): Effects of Copolymer Composition and Intercomponent Miscibility on the Enzymatic Hydrolysis Behavior, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 2830–2838.
- [126] H.N. Cheng, Q.-M. Gu, Enzyme-Catalyzed Reactions of Polysaccharides, in: R.A. Gross, H.N. Cheng (Eds.), *Biocatal. Polym. Sci.*, American Chemical Society, Washington, DC, 2003: pp. 203–216.
- [127] H.N. Cheng, R.G. Nickol, G. Wang, J. Li, Galactosylated hydroxyalkyl polysaccharides, *US6433161 B1*, 2002.
- [128] J. Li, W. Xie, H.N. Cheng, R.G. Nickol, P.G. Wang, Polycaprolactone-Modified Hydroxyethylcellulose Films Prepared by Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization, *Macromolecules*. 32 (1999) 2789–2792.
- [129] J. Kadokawa, Synthesis of Amylose-Grafted Polysaccharide Materials by Phosphorylase-Catalyzed Enzymatic Polymerization, in: P.B. Smith, R.A. Gross (Eds.), *Biobased Monomers Polym. Mater.*, American Chemical Society, Washington, DC, 2012: pp. 237–255.
- [130] Y. Omagari, S. Matsuda, Y. Kaneko, J. Kadokawa, Chemoenzymatic synthesis of amylose-grafted cellulose, *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 450–455.
- [131] T. Tzanov, M. Stamenova, A. Cavaco-Paulo, Phosphorylation of Cotton Cellulose with Baker's Yeast Hexokinase, *Macromol. Rapid Commun.* 23 (2002) 962–964.
- [132] P.L. Granja, L. Pouységu, M. Pétraud, B. De Jésus, C. Baquey, M.A. Barbosa, Cellulose phosphates as biomaterials. I. Synthesis and characterization of highly phosphorylated cellulose gels, *J. Appl. Polym. Sci.* 82 (2001) 3341–3353.

- [133] J. Li, H.N. Cheng, R.G. Nickol, P.G. Wang, Enzymatic modification of hydroxyethylcellulose by transgalactosylation with beta-galactosidases, *Carbohydr. Res.* 316 (1999) 133–137.
- [134] M. Akhtar, E. Dickinson, J. Mazoyer, V. Langendorff, Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin, *Food Hydrocoll.* 16 (2002) 249–256.
- [135] P. Sriamornsak, Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review, *Silpakorn Univ. Int. J.* 3 (2003) 206–228.
- [136] R.L. Whistler, J.N. BeMiller, *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*, Academic Press, San Diego [Calif.], 1993.
- [137] P. Srivastata, R. Malviya, Source of pectin, extraction, and its applications in pharmaceutical industry- an overview, (2011) 10–18.
- [138] A. Allwyn Sundar Raj, S. Rubila, R. Jayabalan, T.. Ranganathan, A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses, *Open Access Sci. Rep.* (2012) 1–4.
- [139] L. Liu, M.L. Fishman, K.B. Hicks, Pectin in controlled drug delivery – a review, *Cellulose.* 14 (2007) 15–24.
- [140] M.A. Rao, H.J. Cooley, Influence of glucose and fructose on high-methoxyl pectin gel strength and structure development, *J. Food Qual.* 17 (1994) 21–31.
- [141] V. Crescenzi, L. Callegaro, Esters Of Pectic And Pectinic Acid - Patent 5384400, *Docstoc.com.* (1993).
- [142] D. Sanchez-Aldana, C.. Aguilar, G.. Nevarez-Moorillon, J.C.. Esquivel, Comparative extraction of pectic and polyphenols from mexican lime pomace and bagasse, *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 8 (2013) 309–322.
- [143] C.L. Jackson, T.M. Dreaden, L.K. Theobald, N.M. Tran, T.L. Beal, M. Eid, et al., Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure, *Glycobiology.* 17 (2007) 805–819.
- [144] K.T. Inngjerdingen, T.R. Patel, X. Chen, L. Kenne, S. Allen, G.A. Morris, et al., Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*, *Glycobiology.* 17 (2007) 1299–1310.

- [145] D. Mohnen, Pectin structure and biosynthesis, *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (2008) 266–277.
- [146] W. Zhang, K.M. Mahuta, B.A. Mikulski, J.N. Harvestine, J.Z. Crouse, J.C. Lee, et al., Novel pectin-based carriers for colonic drug delivery, *Pharm. Dev. Technol.* (2014) 1–4.
- [147] Z.D.N. Abang, S. Meyer Anne, Oxidative enzymatic gelation of sugar beet pectin for emulsion stabilization, *Res. J. Biotechnol.* Vol. 8 (2013) 7.
- [148] J. Jung, L. Wicker, Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability, *Food Hydrocoll.* 28 (2012) 168–173.
- [149] D.N.A. Zaidel, I.S. Chronakis, A.S. Meyer, Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology, *Food Hydrocoll.* 28 (2012) 130–140.
- [150] T. Giancone, E. Torrieri, P.D. Pierro, L. Mariniello, M. Moresi, R. Porta, et al., Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films, *J. Food Eng.* 89 (2008) 195–203.
- [151] P. Di Pierro, L. Mariniello, C.V.L. Giosafatto, P. Masi, R. Porta, Solubility and Permeability Properties of Edible Pectin-Soy Flour Films Obtained in the Absence or Presence of Transglutaminase, *Food Biotechnol.* 19 (2005) 37–49.
- [152] L.W. Jiyoung Jung, Laccase mediated conjugation of heat treated β -lactoglobulin and sugar beet pectin, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 1244–1249.
- [153] J. Jung, L. Wicker, β -Lactoglobulin conformation and mixed sugar beet pectin gel matrix is changed by laccase, *LWT - Food Sci. Technol.* 55 (2014) 9–15.
- [154] Q.M. Gu, R. Nikol, H.N. Cheng, Amine-modified polymers, especially polysaccharides and pectins, and preparation there of for improved gelation, 6,159,721, n.d.
- [155] Gu, Q.-M, Cheng, H.N., R.G. Nickol, Enzyme-catalyzed modification of pectin. *ACS Polym. Prepr.* 2003, 44, 608–609., *ACS Polym Prepr.* (2003) 44, 608–609.
- [156] L.A.M. van den Broek, C.G. Boeriu, Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters, *Carbohydr. Polym.* 93 (2013) 65–72.
- [157] O.B. wurzburg, Introduction, in *Modified Starches: Properties and Uses*, CRC Press Inc. (1986).

- [158] J. Jane, Structural Features of Starch Granules II, in: Starch, Third edition, BeMiller, J. and Whistler, R., (Eds.), 2009: pp. 193–237.
- [159] C. Nawrath, Y. Poirier, C. Somerville, Plant polymers for biodegradable plastics: cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates, *Mol. Breed.* 1 (1995) 105–122.
- [160] R.F. Tester, J. Karkalas, X. Qi, Starch—composition, fine structure and architecture, *J. Cereal Sci.* 39 (2004) 151–165.
- [161] A.H. Young, Fractionation of starch, in: Starch Chem. Technol., Academic Press, in R.L. Whistler, I.N. Bemiller and E.F. Paschall, 1984: pp. 249–283.
- [162] A.P. Anwunobi, M.O. Emeje, Recent Applications of Natural Polymers in Nanodrug Delivery, *J. Nanomedicine Nanotechnol.* s 4 (2011).
- [163] D.R. Lu, C.M. Xiao, S.J. Xu, Starch-based completely biodegradable polymer materials, *EXPRESS Polym. Lett.* 3 (2009) 366–375.
- [164] R.L. Whistler, J.R. Daniel, Starch, in: John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2000.
- [165] K.A. Abbas, S.K. Khalil, A.S.M. Hussin, Modified starches and their usages in selected food products: a review study, *J. Agric. Sci.* 2 (2010) p90.
- [166] A.V. Singh, L.K. Nath, A. Singh, others, Pharmaceutical, food and non-food applications of modified starches: a critical review, *EJEAFChe.* 9 (2010) 1214–1221.
- [167] H.X. Guo, J. Heinämäki, J. Yliruusi, Amylopectin as a subcoating material improves the acidic resistance of enteric-coated pellets containing a freely soluble drug, *Int. J. Pharm.* 235 (2002) 79–86.
- [168] R. Kumar, M.B. Patil, S.R. Patil, M.S. Paschapur, Polysaccharides Based Colon Specific Drug delivery: A, 1 (2002) 334–346.
- [169] H. Rajpurohit, S. Sharma, P. Sharma, A. Bhandari, Polymers for colon targeted drug delivery, *Indian J. Pharm. Sci.* 72 (2010) 689.
- [170] A. Rajan, V.S. Prasad, T. Emilia Abraham, Enzymatic esterification of starch using recovered coconut oil, *Int. J. Biol. Macromol.* 39 (2006) 265–272.
- [171] A. Rajan, J.D. Sudha, T.E. Abraham, Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase, *Ind. Crops Prod.* 27 (2008) 50–59.

- [172] A. Rajan, T.E. Abraham, Enzymatic modification of cassava starch by bacterial lipase, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 29 (2006) 65–71.
- [173] S. Chakraborty, B. Sahoo, I. Teraoka, L.M. Miller, R.A. Gross, Enzyme-Catalyzed Regioselective Modification of Starch Nanoparticles, *Macromolecules*. 38 (2005) 61–68.
- [174] A. Alissandratos, N. Baudendistel, S.L. Flitsch, B. Hauer, P.J. Halling, Lipase-catalysed acylation of starch and determination of the degree of substitution by methanolysis and GC, *Bmc Biotechnol.* 10 (2010) 82.
- [175] R. Lin, H. Li, H. Long, J. Su, W. Huang, Synthesis of Rosin Acid Starch Catalyzed by Lipase, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014).
- [176] P.A. Wilbon, F. Chu, C. Tang, Progress in Renewable Polymers from Natural Terpenes, Terpenoids, and Rosin, *Macromol. Rapid Commun.* 34 (2013) 8–37.
- [177] R. Lin, H. Li, H. Long, J. Su, W. Huang, Structure and characteristics of lipase-catalyzed rosin acid starch, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 352–359.
- [178] X. Lu, Z. Luo, X. Fu, Z. Xiao, Two-step method of enzymatic synthesis of starch laurate in ionic liquids, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 9882–9891.
- [179] J.-Y. Xin, Y. Wang, T. Liu, K. Lin, L. Chang, C.-G. Xia, Biosynthesis of Corn Starch Palmitate by Lipase Novozym 435, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 7226–7236.
- [180] J.A. Akkara, M.S. Ayyagari, F.F. Bruno, Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 67–73.
- [181] F.F. Bruno, J.A. Akkara, M. Ayyagari, D.L. Kaplan, R. Gross, G. Swift, et al., Enzymatic Modification of Insoluble Amylose in Organic Solvents, *Macromolecules*. 28 (1995) 8881–8883.
- [182] F.F. Bruno, J.S. Dordick, D.L. Kaplan, J.A. Akkara, Regioselective enzymatic transesterification of polysaccharides in organic solvent, in: *Enzym. Polym. Synth.*, 1998 American chemical society, Gnoss, R.A. Kaplan, D. Swift, G., 1998: pp. 167–174.
- [183] F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, Enzyme Initiated Radical Polymerizations, *Polymers*. 4 (2012) 759–793.
- [184] R.L. Shogren, J.L. Willett, A. Biswas, HRP-mediated synthesis of starch–polyacrylamide graft copolymers, *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 189–191.

Bibliographie

- [185] R.L. Shogren, A. Biswas, Preparation of starch–sodium lignosulfonate graft copolymers via laccase catalysis and characterization of antioxidant activity, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 581–585.

Assemblage des polysaccharides pour vectoriser un principe actif

III. Assemblage des polysaccharides pour vectoriser un principe actif

III.1 Introduction

L'auto-assemblage de structures est la future génération de synthèse des matériaux. Ce processus ayant une crédibilité équivalente aux approches biologiques n'est pas facile à faire et nécessite de pouvoir contrôler les interactions entre les structures.

L'objectif de ce chapitre est de présenter une vue d'ensemble sur une des applications des polysaccharides modifiés par introduction d'une fonctionnalité. Ces applications étudiées concernent principalement l'assemblage et la vectorisation d'un principe actif dans une microparticule formée de polysaccharides.

III.2 Définition

L'encapsulation/vectorisation tombe aussi bien dans le domaine de la physicochimie que de la physique. C'est une technologie qui vise à piéger un principe actif (vitamines, microorganismes etc), dans un vecteur en vue de le protéger et d'assurer le contrôle de son libération (Qian, 2013). De plus, elle permet de résoudre les problèmes de stabilité de ces principes actifs.

III.3 Histoire de l'encapsulation

La coacervation, un phénomène physique permettant de réaliser des systèmes colloïdaux, a été découvert par Bungenburg de Jong et Kaas en 1931, qui ont mené les premiers essais d'encapsulation (Boh, 2007). Dans les années qui ont suivi, des nouvelles méthodes sont apparues, et il existe aujourd'hui toute une variété de méthodes d'encapsulation (Gouin, 2004; Anal et Singh, 2007).

III.4 Systèmes d'encapsulation

La recherche dans le domaine de la microencapsulation concerne en effet les vecteurs de types nano- et microparticules formulés à base de polymère ou de lipide. Ils existent trois

types de systèmes particuliers d'encapsulation de principes actifs qui diffèrent par la taille et la structure : les microparticules, les nanoparticules et les liposomes.

III.4.1 Microparticules

Elles présentent une taille comprise entre 1 et 1000 μm . Deux structures peuvent exister : les microsphères et les microcapsules (Figure 11).

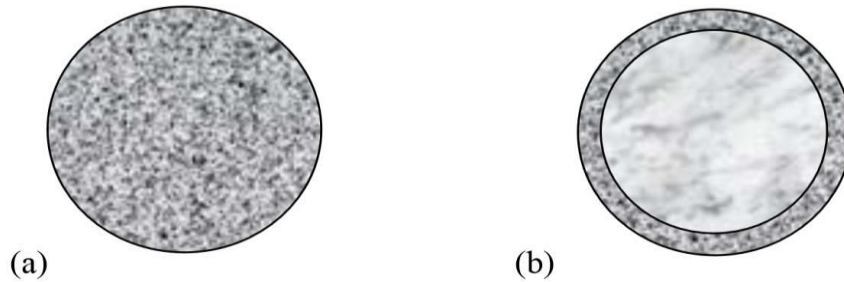


Figure 11 : Microsphère (a) et microcapsule (b) (Richard, Benoit, & Venier-Julienne, 2013)

Une microsphère est une particule de matrice solide dans laquelle s'enferme le principe actif alors qu'une microcapsule est un réservoir constitué d'un noyau interne contenant le principe actif et d'une enveloppe externe constitué de polymères synthétiques (comme les copolymères des acides lactique et glycolique), de polymères hémisynthétiques (dérivés de cellulose) ou de polymères naturels (chitosane, alginate, gélatine...) ou encore de lipides (acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérols...) (Richard et al., 2013)

III.4.2 Nanoparticules

Les nanoparticules sont des systèmes de vectorisation constitués de polymères biodégradables, ou de lipides capables de séquestrer et/ou adsorber une ou des molécules actives. Leurs tailles sont comprises entre 10 et 1000 nm. Quatre structures peuvent exister à base de deux structures initiales : les nanosphères et les nanocapsules (Jawahar & Meyyanathan, 2012) (Figure 12).

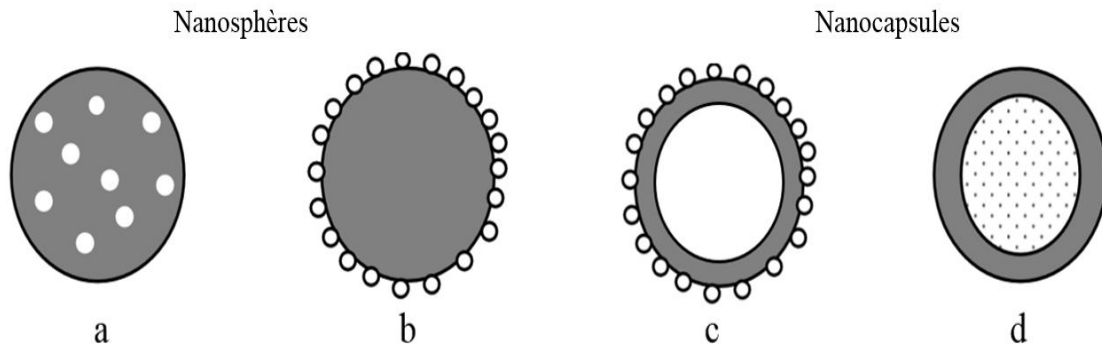


Figure 12 : Représentation des quatre structures des nanoparticules et des nanosphères (NS) (a), nanosphères + principe actif adsorbé (b), nanocapsules (NC) avec un principe actif dissous (c) ou dispersé (d) (Legrand et al., 2007)

- Les nanosphères (NS) dans lesquelles le principe actif est dispersé ou dissous dans la matrice de polymère, ou de lipides (Figure 12 a).
- Les nanosphères avec le principe actif adsorbé à la surface, profitant ainsi de la surface spécifique élevée due à la faible taille des nanoparticules (Figure 12 b).
- Les nanocapsules (NC), constituées d'un cœur liquide entouré d'une fine membrane de polymère dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres et avec le principe actif adsorbé à la surface (Figure 12 c).
- Les nanocapsules avec le principe actif encapsulé dans le cœur de la nanocapsule (Figure 12 d).

III.4.3 Liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées par des bicouches lipidiques concentriques, enfermant entre elles des compartiments aqueux (Figure 13). Ceci leur permet de véhiculer les substances hydrophiles et lipophiles tout en restant stables (Wallace & Wrenn, 2015). Ils ont été décrits premièrement par l'hématologue Dr Alec Bangham en 1961 (Bangham & Horne, 1964).

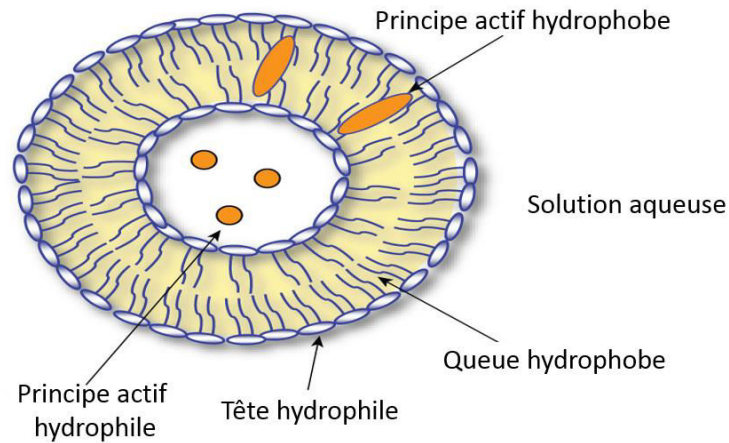


Figure 13 : Schéma d'un liposome formé par des phospholipides en une solution aqueuse (modifiée de (Lembo & Cavalli, 2010))

Dans la suite de ce chapitre, les parties qui suivent focalisent sur les nano- et les microparticules que les auteurs s'y intéressent le plus dans leurs travaux.

III.5 La morphologie des particules

En fonction de la méthode d'encapsulation, les particules peuvent prendre différentes morphologies (Figure 14). La forme la plus courante de la particule est celle d'une forme sphérique. Cette conception peut être subdivisée en différents types de structures. Le terme "beads" définit les sphères solides tandis que le terme "hollow beads" ou les sphères creuses définit les particules avec un noyau liquide. En biotechnologie classique, ce dernier système de particule où le biocatalyseur est maintenu derrière une membrane semi-perméable est défini comme "microcapsule", indépendamment de la taille. Cependant, certains auteurs définissent la microencapsulation comme la production de particules en microtaille (10-100µm), par opposition à la macroencapsulation (>100 µm) (John, Tyagi, Brar, Surampalli, & Prévost, 2010). Les sphères et les sphères creuses peuvent être entourées de matériaux appropriés pour former des billes revêtues. Des combinaisons de structures permettront la conception de « particules à plusieurs compartiments » avec plusieurs cœurs et / ou des revêtements. Des gouttelettes peuvent également être obtenues par extrusion sur une surface plane résultant en

des capsules de forme semblable à une lentille. Dans tous ces systèmes, un médicament ou un agent biologique peuvent être incorporés.

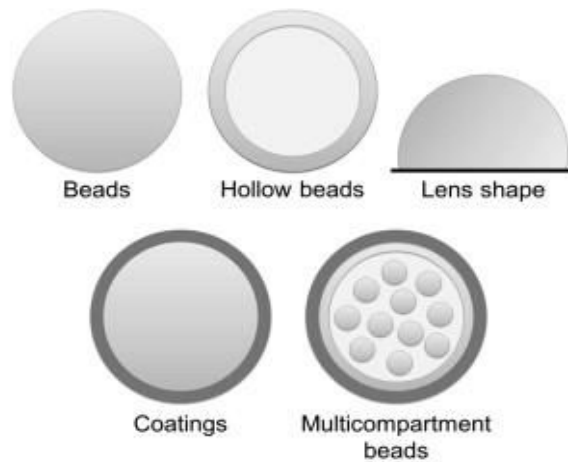


Figure 14: La morphologie de différentes particules: sphères (beads), sphères creuses (hollow beads), particules en forme de lentilles (lens shape particles), sphères revêtues (coated beads) et (particules à plusieurs compartiments (multicompartment beads) (Vemmer & Patel, 2013)

III.6 Facteurs influençant la taille des particules

Différents paramètres peuvent influencer la taille des particules, tels que la concentration du polymère, la température de processus de la formation des particules, la vitesse d'agitation dans l'étape d'émulsion, et la quantité d'émulsifiant utilisée dans le cas de l'utilisation de la méthode de double émulsion pour former les particules (Jain, 2000; Sameni, Krigstin, & Sain, 2015; Thummala, Leach, & O'Rear, 2003).

Concentration en polymère : en tenant compte de l'effet de la concentration en polymère, il est rapporté que l'augmentation de la concentration du polymère augmente la taille des sphères (Srivastava, Ridhurkar, & Wadhwa, 2005).

Température : la taille des microsphères est dépendante de la température. Les températures faibles et élevés produisent des microsphères plus grandes tandis que les températures intermédiaires produisent des sphères plus petites (Y.-Y. Yang, Chung, Bai, & Chan, 2000).

Vitesse d'agitation: une bonne vitesse d'agitation est importante pour contrôler le mécanisme de formation de particules (Moribe, Kitayama, Suzuki, & Okubo, 2012). Plusieurs études ont été faites sur la variation de la taille des microsphères en fonction de la vitesse d'agitation et ils ont montré que la taille des microsphères diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (M. Li, Rouaud, & Poncelet, 2008; Y. Y. Yang, Chung, & Ng, 2001). De plus, une étude faite avec différente vitesse d'agitation a montré que plus la vitesse d'agitation est élevée, plus la teneur en molécule active diminue (Jelvehgari, Dastmalch, & Nazila, 2012).

III.7 Formulations des particules

Pour formuler des particules à base de polymères, ces derniers doivent former une liaison soit covalente soit électrostatique forte entre eux, pour protéger la molécule active de se diffuser à l'extérieur de la particule.

Les polysaccharides peuvent être divisés en des polyélectrolytes et des non-polyélectrolytes. Les premiers peuvent être divisés en des polysaccharides chargés positivement tels que le chitosane, et des polysaccharides chargés négativement tels que l'alginate, l'héparine, l'acide hyaluronique, pectine, etc.). La charge des biopolymères est due à la présence des groupements réactifs tels que, le carboxyle et l'amine.

Des nombreuses études a été faite pour formuler des particules constituées de biopolymères simples tels que la synthèse des nanoparticules à base de chitosane (Prabaharan & Mano, 2005), des microparticules d'alginate (Zhang, Jia, Wang, Liu, & Ma, 2011), des nanoparticules de cellulose (Abdollahi, Alboofetileh, Behrooz, Rezaei, & Miraki, 2013), ou des nanoparticules formés par un assemblage de polymères tels que chitosane/dextrane sulfate (Y. Chen, Mohanraj, & Parkin, 2003), chitosane/carboxymethyl cellulose (Ichikawa, Iwamoto, & Watanabe, 2005), et chitosane/pectine (Birch & Schiffman, 2014a).

Les biopolymères utilisés dans cette thèse sont le chitosane et la pectine. L'avantage de ces deux polysaccharides, c'est qu'ils peuvent être fonctionnalisés par approche enzymatique

aboutissant au chitosane fonctionnalisé (Aljawish et al., 2012a) et à la pectine fonctionnalisée (ce travail).

Ces polysaccharides sont chimiquement réactifs et ils possèdent des caractères poly-fonctionnels bien spécifiques qui justifient leur usage. Le chitosane possède des fonctions amines primaires qui lui donnent une charge globale positive alors que la pectine possède des groupements carboxyles responsables de sa charge négative. Par conséquent, ils peuvent s'auto-assembler.

III.8 Le principe actif : la curcumine

La curcumine est un composé phénolique naturel qui provient d'une plante herbacée rhizomateuse de la famille des Zingibéracées *Curcuma longa* (Figure 15). Le rhizome de cette plante est séché et broyé en poudre pour donner le curcuma qui est l'une des épices utilisées dans la cuisine asiatique et indienne (Araújo & Leon, 2001). La couleur jaune du curcuma provient d'un mélange de pigments phénoliques, les curcuminoïdes, dont la curcumine fait partie.

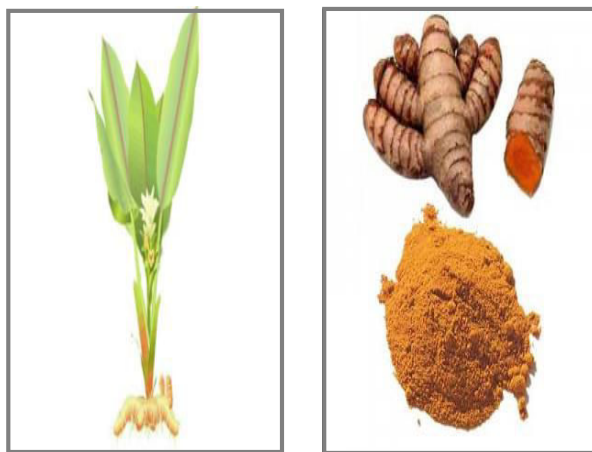


Figure 15: Photo de *Curcuma Longa* (à gauche), la plante d'où est extrait le curcuma, de sa racine et de l'épice (à droite) (adapté de A. Kumar, Dora, & Singh, 2011)

La raison du choix de la curcumine comme principe actif revient au fait que la curcumine est une molécule polyphénolique modèle, facile à doser et qui a une activité antioxydante

importante. Il sera donc intéressant d'encapsuler cette molécule antioxydante dans une microparticule formée de polysaccharides ayant des fonctionnalités antioxydantes ; et voir si cela améliore le pouvoir antioxydant du système.

III.8.1 Structure de la curcumine

La curcumine [1,7-bis (-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6 heptadiène -3,5 dione] (ou diféruloylméthane) est une molécule contenant deux noyaux phénoliques identiques séparés par une courte chaîne d'hydrates de carbone. Sa structure est symétrique et contient deux fonctions cétone, deux fonctions alcool et deux fonctions éther (Figure 16).

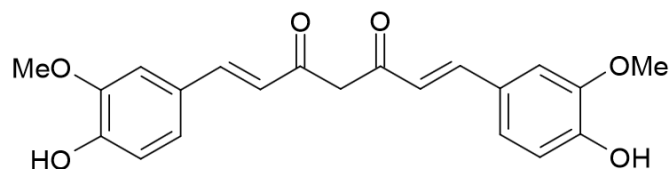


Figure 16 : Structure de la curcumine (Yamaguchi, Moore, Sun, Snyder, & Shoji, 2012)

III.8.2 Propriété de la curcumine

- **Solubilité :** La curcumine est peu soluble dans l'eau acidulée. Elle est soluble en solution alcaline où la solution passe du jaune clair au rouge-brun. L'ordre de solubilité de la curcumine dans certains solvants organiques est le suivant: acétone > éthyl méthyl cétone > éthyl acetate > méthanol > éthanol > 1,2 dichloroéthane > isopropanol > éther > benzène > hexane (Garcia, Vera, & Madsen, 2010).
- **Stabilité:** En solution alcaline et à pH neutre, la curcumine est instable et se dégrade en 30 min en trans-6-(40-hydroxy-30-méthoxyphényl)-2,4-dioxo-5-hexanal, acide férulique, féruloyl méthane et vanilline. Dans des conditions acides, la dégradation de la curcumine est beaucoup moins rapide, avec moins de 20 % de curcumine totalement dégradé après 1 heure (Kumavat et al., 2013). Les mécanismes de dégradation en milieu alcalin, sont résumés dans la Figure 17.

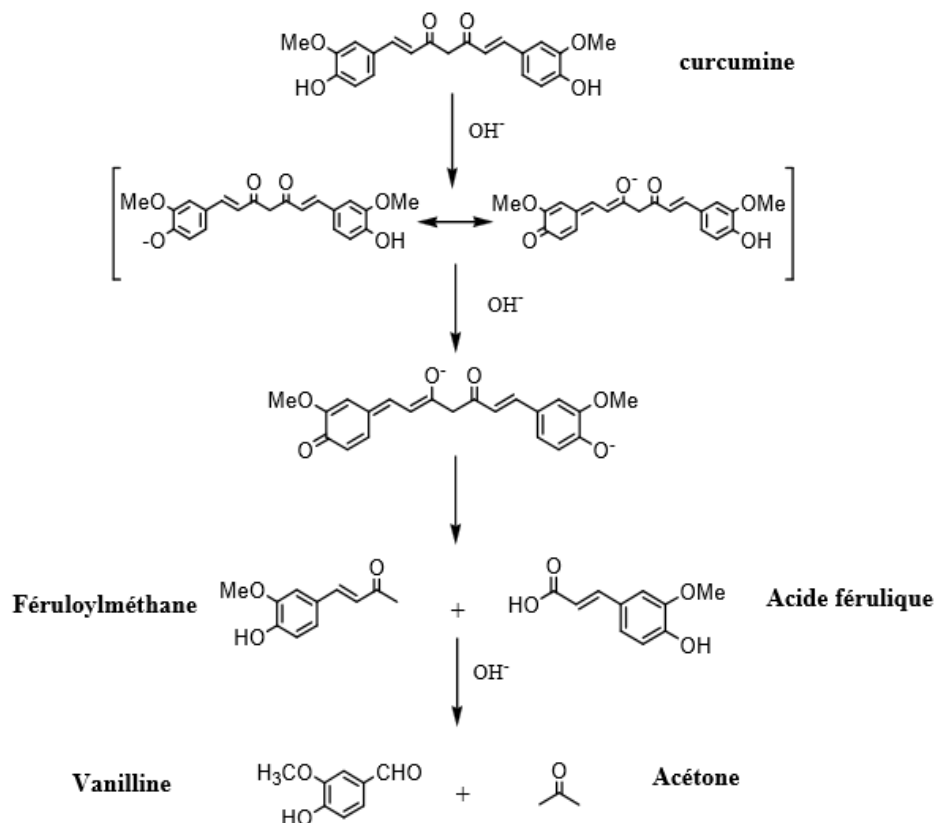


Figure 17: Dégradation de la curcumine en milieu alcalin (Tønnesen & Karlsen, 1985)

Stabilité photochimique : lorsque la curcumine est exposée à la lumière UV-visible, elle se décompose, aussi bien en solution qu'à l'état solide. La dégradation photochimique de la curcumine dans une solution d'isopropanol réalisée à une longueur d'onde supérieure à 400 nm, conduit à un produit principal de cyclisation, formé par l'élimination de deux hydrogènes, et à plusieurs produits mineurs dont la vanilline, le 4-vinylgâïacol, l'aldéhyde férulique, l'acide vanillique et l'acide férulique (Tønnesen, Karlsen, & van Henegouwen, 1986)

III.8.3 Applications de la curcumine

Des nombreuses d'études ont démontré les effets de la curcumine dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et autres.

La non toxicité de la curcumine a permis son utilisation en tant qu'épice, arôme et colorant (Tønnesen et al., 1986). L'encapsulation de la curcumine sèche avec des mélanges alimentaires secs dans un revêtement soluble dans l'eau permet de travailler indépendamment du pH (par

exemple, en combinant physiquement la curcumine avec un acide) .Ce produit est alors convenable pour colorer des puddings ou des sauces instantanées (Leshik, 1981).

D'autre part, la curcumine est prouvée une molécule inhibitrice de la majorité des médiateurs d'inflammation (Aggarwal & Harikumar, 2009; Mahmoud, 2007). La curcumine et ses dérivés possèdent bien d'autres activités biologiques, comme l'activité antioxydante (Asouri, Atatee, Ahmadi, Amini, & Moshaei, 2013), anti-hépatotoxique (García-Niño et al., 2013), anti-rhumatismale, anti-allergique et anti-microbale (X. Fan, Zhang, Liu, Yan, & Liang, 2013) et anti-cancérogène (Lee et al., 2013).

III.9 Méthode d'encapsulation

La diversité des méthodes d'encapsulation rend complexe le choix de la technique la plus adaptée aux objectifs spécifiques recherchés.

Généralement, les particules sont formées soit par émulsification et solidification des gouttelettes de liquide pour former des particules soit par formation de gouttelettes (égouttage ou dripping). Les méthodes sont subdivisées selon le mode de formation des gouttelettes et sont ensuite classées selon le procédé de gélification ou de formation de membrane.

III.9.1 Extrusion-Dripping ou égouttage

Une méthode simple pour former des gouttelettes consiste à extruder un liquide à travers une aiguille d'une seringue et permettre à la gouttelette de durcir dans une solution appropriée. Grâce à cette méthode, une distribution de taille de particule étroite est obtenue. Cependant, en fonction du diamètre de l'aiguille de relativement grosses particules peuvent être produites et la capacité de production est limitée par la vitesse de formation des gouttelettes. Des dispositifs avec des applications de pression, une augmentation du nombre de gouttes, ou de systèmes de coupure des gouttelettes (de débit d'air coaxial, générateur électrostatique de gouttelettes...) sont utilisés pour obtenir des gouttelettes plus petites à des débits plus importants.

Généralement, cette méthode est utilisée pour former des particules d'alginate (Lee, Ravindra, & Chan, 2013).

Dans cette classe on peut distinguer les méthodes suivantes : la gélification des gouttes, le séchage par atomisation ou « spray drying », la coacervation simple et complexe.

III.9.1.1 Gélification de gouttes

La gélification thermique « hot melt » et la gélification ionique sont deux procédés de la gélification de gouttes. Dans la gélification thermique, les particules sont obtenues en égouttant une solution chaude de polymère dans une solution de réticulation froide (Figure 18). Cette technique consiste à utiliser des polymères hydrophiles qui se gélifient lors du refroidissement tels que le carraghénane, la gomme, la gélatine et l'agarose. Cette gélification est thermoréversible c'est-à-dire que le gel se ramollit à des températures élevées. Un exemple est celui de la formation des microparticules de gélatine et de chitosane encapsulant l'indométhacine comme principe actif (W.-J. Lin & Kang, 2003)

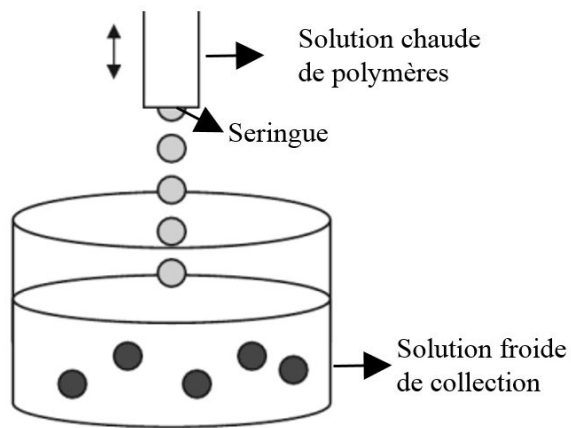


Figure 18 : Schéma de la gélification thermique (Legrand et al., 2007)

La gélification ionique consiste à extruder à travers d'une aiguille de seringue une solution aqueuse de polymère dans laquelle le principe actif est dissout, dispersée ou émulsionnée. Les gouttelettes formées sont recueillies dans une phase liquide dispersante pour se transformer, après interactions ioniques, en particules de gel sphériques. Par exemple, des

nanoparticules de chitosane : pectine sont synthétisés par cette méthode. Ces nanoparticules sont stables dans une marge de pH de 3,5 à 6 et elles perdent de stabilité après 14 jours de stockage dans un milieu aqueux (Birch & Schiffman, 2014b).

III.9.1.2 Séchage par atomisation ou « Spray drying »

C'est la technique de microencapsulation la plus utilisée dans l'industrie alimentaire pour la préparation d'additifs alimentaires secs et stables (K. G. H. Desai & Jin Park, 2005). L'amidon modifié, la maltodextrine, la gomme et d'autres substances sont hydratés pour servir de matrice de la paroi des particules. Le principe actif à encapsuler, est homogénéisé avec les polymères de la matrice. Le mélange est ensuite introduit dans un séchoir à pulvérisation « spray dryer » et pulvérisé. L'eau est évaporée suite au contact de l'air chaud avec la matière atomisée. Les capsules sont ensuite recueillies après leur chute au fond du séchoir (Figure 19).

Une des limites de cette technique est le nombre limité de matériaux formant la matrice, parce qu'ils doivent être relativement soluble dans l'eau (K. G. H. Desai & Jin Park, 2005). Un exemple de l'utilisation de cette technique est l'encapsulation de la curcumine dans des particules à base de chitosane/Tween 20. Des particules sphériques de diamètre 285 ± 30 nm ont été obtenues (O'Toole et al., 2012).

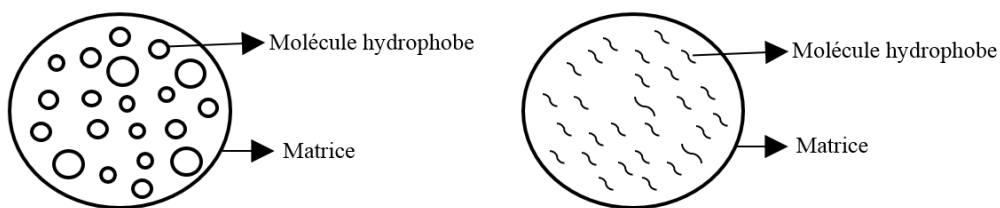


Figure 19 : Schéma du spray-drying (modifié d'après Fang & Bhandari, 2010)

III.9.1.3 Coacervation

La coacervation est une des plus simples et plus anciennes méthode d'encapsulation utilisée (Wedlock, 2012). Ses conditions de préparation sont simples comme l'usage d'un solvant non-toxique et d'une faible agitation. Deux phases liquides sont formées durant ce

processus : l'une riche en polymère appelée coacervat et l'autre pauvre en polymère. La coacervation consiste en une séparation de phase d'un ou plusieurs hydrocolloïdes de la solution initiale et le dépôt ultérieur de la phase coacervat nouvellement formée autour de l'ingrédient actif en suspension ou en émulsion dans le même milieu réactionnel (Gouin, 2004). Une fois les gouttelettes de coacervat obtenues, elles sont réticulées par un agent de solidification et les microparticules sont lavées, filtrées ou centrifugées puis séchées (Figure 20). Ce procédé permet l'encapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles (Visakh, Ozguz, & Guillermo, 2014). La coacervation simple peut être réalisée avec une seule substance en solution colloïdale telle que la gélatine. Alors que la coacervation complexe, implique des réactions entre deux polymères de charges opposées tels que la pectine et le chitosane, la pectine et la gélatine, l'alginate et la gélatine (Jyothi et al., 2010)... La nature et la concentration du polymère utilisée et le pH de la solution et la vitesse d'agitation du système sont des paramètres importants dans la micro-encapsulation par coacervation (Saravanan & Rao, 2010).

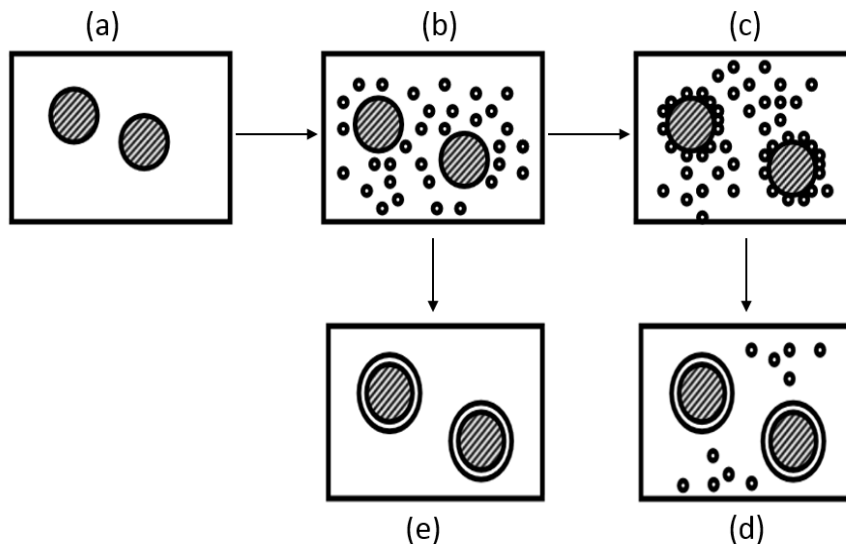


Figure 20 : Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt du coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu (d), solidification de l'enveloppe (e) (modifié d'après Jyothi et al., 2010)

III.9.2 Emulsion et évaporation de solvant

Une émulsion est constituée d'au moins deux liquides non miscibles, le plus souvent sous forme d'huile et d'eau, avec l'un des liquides dispersé sous forme de fines gouttelettes sphériques dans l'autre (Surh, Decker, & McClements, 2006). Les émulsions peuvent être classées en fonction de l'organisation spatiale des phases huileuse et aqueuse ; c'est-à-dire des gouttelettes d'huile dispersées dans une phase aqueuse est appelé une émulsion huile-dans-eau (H / E), alors qu'un système constitué de gouttelettes d'eau dispersées dans une phase huileuse est appelée eau-dans-huile. Pour obtenir une solution stable cinétiquement, des stabilisants tels que des tensioactifs, sont couramment ajoutés à des systèmes d'émulsion.

Cette technique consiste à dissoudre le polymère hydrophobe dans un solvant organique peu miscible dans l'eau (ex. dichlorométhane), puis, le principe actif apolaire est dispersé dans la solution de polymère. Le mélange polymère-principe actif-solvant organique est émulsifié dans un volume d'eau important contenant des tensioactifs (l'alcool polyvinylique), pour obtenir une émulsion huile-dans-eau (Legrand et al., 2007).

Dans le cas où le principe actif est polaire une double émulsion est formée. Une solution aqueuse dispersant la molécule hydrophile est émulsionnée dans un solvant organique volatil contenant le polymère. L'émulsion résultante, qui est appelé l'émulsion primaire, est émulsionné à l'huile donnant une émulsion double de type Eau/huile/huile (Jelvehgari & Montazam, 2012). Il est possible aussi de former des émulsions multiples de type eau/huile/eau (Legrand et al., 2007).

La dernière étape dans la préparation des microsphères selon cette méthode est l'évaporation du solvant sous pression atmosphérique ou pression réduite et sous agitation lente (Makadia & Siegel, 2011).

Cette technique est déconseillée si le principe actif est volatil ou s'il possède une grande affinité pour la phase continue aqueuse (Zuidam & Nedovic, 2009).

III.9.3 Applications de l'encapsulation

L'encapsulation a des applications diverses allant du traitement médical à l'agriculture durable, de la cosmétique à l'industrie automobile. Dans ce qui suit deux importants domaines d'applications de l'encapsulation seront abordés : les domaines alimentaires et pharmaceutiques.

III.9.3.1 Domaine alimentaire

L'encapsulation est un procédé de piégeage des agents actifs qui permet d'augmenter la longévité et de contrôler la libération du contenu (arômes, vitamines, minéraux, enzymes, micro-organismes alimentaires...). Les matériaux utilisés pour la conception des capsules (ex. microparticules) doivent être de nature alimentaire, biodégradable tels que les polysaccharides, et en mesure de former une barrière entre la phase interne et environnement externe (Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, Levic, & Bugarski, 2011).

Certains chercheurs ont résumé les raisons de l'encapsulation dans ce domaine de l'agroalimentaire comme suit (K. G. H. Desai & Jin Park, 2005; Sagis, 2015) :

- La protection de la matière à encapsuler de la dégradation par la réduction de sa réactivité dans un environnement extérieur, due aux effets indésirables de la lumière, de l'humidité et de l'oxygène, contribuant ainsi à une augmentation de la durée de conservation du produit, et de promouvoir une libération contrôlée de la particule (Gibbs, Kermasha, Alli, & Mulligan, 1999);
- La réduction de l'évaporation ou de la vitesse de transfert de l'ingrédient actif à l'environnement externe ;
- La modification des caractéristiques physiques de la matière active pour permettre une manipulation plus aisée ;

- L'adaptation de la libération de la matière active lentement avec le temps, ou à un moment donné ;
- Pour masquer un goût indésirable de l'ingrédient actif ;
- La dilution de la matière lorsque seulement des petites quantités sont requises, tout en assurant une dispersion uniforme dans la capsule ;
- Pour aider à séparer les composants d'un mélange qui, autrement réagiraient avec les autres composants.

III.9.3.2 **Domaine pharmaceutique et médicale**

Les applications de l'encapsulation dans le domaine pharmaceutique et médicale sont montrées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Les applications de l'encapsulation dans le domaine pharmaceutique et médicale

Applications	Références
Immobilisation de l'agent actif encapsulé et une protection efficace contre la dégradation	Nasseau, Boublik, Meier, Winterhalter, & Fournier, 2001; Z. Zhang & Feng, 2006
Administration facile du médicament et contrôle de la vitesse de libération	Singh et al., 2010
L'encapsulation des cellules pour la transplantation cellulaire et pour traiter beaucoup de maladies (désordres neurologiques, cancer...)	Zanin et al., 2012

Objectifs du travail

Objectifs du travail

Comme décrit dans la partie bibliographique, la laccase est capable de catalyser l'oxydation de différents composés phénoliques en générant un grand nombre de dérivés quinoniques ou semi-quinoniques très réactifs, qui se condensent rapidement en milieu aqueux. Dans le but d'obtenir des polymères fonctionnels, une solution pourrait être de greffer ces intermédiaires dès leur formation sur des macromolécules en milieu aqueux.

Dans des travaux précédents réalisés au laboratoire LIBio par Mustafa en 2005, Issa en 2009, et Aljawish en 2014, il a été montré qu'une oxydase comme la laccase de *Myceliophthora thermophila* pouvait oxyder en milieu diphasique certains acides cinnamiques tels que les acides férulique et sinapique avec, initialement, formation de dimères fortement colorés en rouge orangé afin de produire de nouveaux colorants (Mustafa et al., 2005). Si l'on ajoute dans le milieu réactionnel une macromolécule susceptible de réagir avec les produits de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique et du férulate d'éthyle, comme le chitosane, il est possible de former des chitosanes fonctionnalisés dans des conditions douces et en milieu aqueux. Des tests d'activités ont montré que ce nouveau polymère à base de chitosane améliore l'adhésion des cellules saines (HUVEC), et présente des propriétés antioxydantes et antibactériennes (Aljawish et al., 2014).

L'objectif principal de ce travail était de fonctionnaliser la pectine avec les produits d'oxydation de l'acide férulique selon deux méthodes, le greffage covalent et l'adsorption, permettant d'obtenir deux nouvelles formes de pectine fonctionnalisée.

Dans un premier temps, il s'agira de greffer les produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine en présence de la laccase de *Myceliophthora thermophila* dans des conditions douces, en milieu aqueux (30 °C et pH 7,5), afin d'obtenir une nouvelle pectine fonctionnalisée, notée pectine-F.

Objectifs

Dans un deuxième temps, il s'agira de préparer préalablement les produits d'oxydation de l'acide férulique (POX) en présence de laccase, puis de les ajouter sur la pectine par adsorption physique. Cette procédure conduit à la pectine-POX.

Sur le plan scientifique, un premier objectif est la mise en évidence des modifications structurales apportées à la pectine au cours de sa fonctionnalisation. Un deuxième objectif est l'étude de l'impact de la fonctionnalisation de la pectine sur ses propriétés physico-chimiques et biologiques.

Le choix de la pectine comme objet d'étude se justifie par son abondance et ses propriétés techno-fonctionnelles intéressantes. De plus, ce biopolymère est biodégradable et non toxique. Il est très connu pour son action texturant, gélifiant ou stabilisant. Il est également soluble dans l'eau à pH 7,5 qui correspond au pH optimal de la laccase choisie pour réaliser cette étude. Enfin, les pectines peuvent être naturellement féruloylées, ce qui leur confère des propriétés potentiellement intéressantes. Toutefois, ces formes sont peu disponibles. Le greffage ou l'adsorption de phénols pourrait constituer une alternative pertinente pour produire des dérivés de pectine enrichis en phénols. Au niveau réactionnel, les groupements carboxyles et hydroxyles de la pectine constituent les principales fonctions susceptibles d'être impliquées dans les réactions de couplage ou les interactions avec les produits d'oxydation de l'acide férulique.

Enfin le choix du biocatalyseur s'est porté sur la laccase de *Myceliophthora thermophila* car celle-ci possède un pH optimal d'activité voisin de la neutralité et cette enzyme est bien connue au laboratoire.

Plan de l'étude

Ce travail est divisé en trois grandes parties :

- Une première partie est consacrée à l'étude de la faisabilité de la fonctionnalisation de la pectine par greffage covalent des produits d'oxydation de l'acide férulique (obtention de la pectine-F). Ce volet est divisé en deux sous-parties :

- Cinétique de la réaction d'oxydation enzymatique en présence de la pectine ; étude structurale de la pectine native et fonctionnalisée (chapitre I)
- Evaluation des propriétés physico-chimiques et antioxydantes de la pectine native et de la pectine fonctionnalisée (chapitre II)

- Une deuxième partie porte sur la fonctionnalisation de la pectine par adsorption des composés phénoliques issus de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique (obtention de la pectine-POX) (chapitre III).

Cette étude comporte la caractérisation structurale de la pectine-POX et la détermination de ses propriétés physicochimiques. Celles-ci seront comparées à celles de la pectine-F afin d'évaluer l'impact du mode de fonctionnalisation sur les propriétés du polymère.

- Une troisième partie est consacrée à l'élaboration d'une matrice mixte, constituée à partir de deux polysaccharides, la pectine de citron et le chitosane de crevette. Dans ces assemblages, les polysaccharides seront utilisés soit sous leur forme native, soit sous une forme fonctionnalisée. Le travail s'articule autour de deux sous-parties (chapitre IV) :

- La caractérisation des nouveaux copolymères du point de vue de leur taille et de leur charge ;
- L'évaluation et la mesure de l'efficacité de cet assemblage pour l'encapsulation d'un principe actif modèle, la curcumine.

Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes

I. Biocatalyseur et produits chimiques

Laccase de *Myceliophthora thermophila* (E.C. 1.10.3.2)

La laccase du champignon *Myceliophthora thermophila* est produite en trois étapes (Berka et al., 1997) et elle est commercialisée par la société Novozymes A/S sous le nom « Subérase® ». La laccase se présente sous la forme d'un liquide brun et d'après la fiche technique, l'enzyme, présentant une masse molaire de 85 kDa (Aljawish et al., 2014), est stable à 25 °C pendant trois mois et possède une activité optimale à pH 7,5 et à 30°C. Cette préparation enzymatique est fournie avec une activité de 10500 UI/mL (une unité enzymatique étant définie comme la quantité en 0,01 µM de syringaldazine oxydée en une minute, à pH 7,5 et à 30°C).

I.1 Produits chimiques

Les différents produits chimiques utilisés sont répertoriés dans les tableaux suivants.

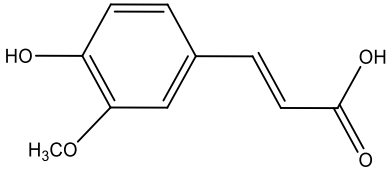
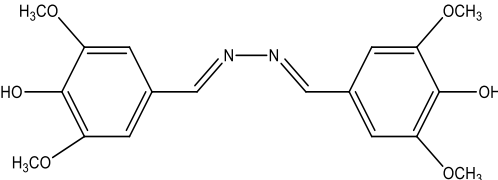
Tableau 2 : Solvants utilisés

Désignation	Fournisseur	Référence
Méthanol	Carlo - Erba	525102
Ethanol	Prolabo	MC310653
Acide acétique	Prolabo	20104.334
Acétonitrile	Carlo - Erba	412412
Acide trifluoroacétique (TFA)	Sigma-Aldrich	T-6508
Acide chlorhydrique 1 M	Sigma-Aldrich	35328

Tableau 3 : Produits chimiques utilisés

Produit	Fournisseur	Référence
Chitosane de faible poids moléculaire	Sigma-Aldrich	448869
Pectine LM avec ≥ 74 % acide galacturonique ; DE $\geq 6,7$ %	Sigma-Aldrich	P9135
Hydroxyde de potassium	Merck	100778
1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich	D9132
2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS)	Sigma-Aldrich	A1888
Phosphate de sodium monosodique	Prolabo	28.011
Phosphate de sodium disodique	Prolabo	28026.292
Acide bicinchoninique	Sigma-Aldrich	B9643
Chlorure de sodium	Prolabo	27810.295
Chlorure de calcium	Prolabo	22322.295
Hydroxyde de sodium	Fluka	71690
Carbonate de sodium 99,5 %	Carl ROTH	A135.2
Sérum Albumine Bovine (SAB)	Sigma-Aldrich	P0914

Tableau 4 : Substrats phénoliques utilisés

Désignation	Fournisseur	Référence	Structure
Acide férulique 99%	Sigma-Aldrich	12,870-8	
Syringaldazine	EGA-Chemie	17,753-9	

II. Oxydation enzymatique des composés phénoliques

II.1 Purification partielle de la laccase de *Myceliophthora thermophila*

Une ultrafiltration sous azote est utilisée à la température de 4 °C pour éliminer les peptides et les protéines de taille inférieure à 10 kDa contenus dans l'extrait enzymatique ainsi que les phénols qui lui confèrent une coloration brune suivant la méthode décrite par Aljawish et al. (2014).

Le système d'ultrafiltration est une cellule Amicon-8200 de 20 mL équipée d'une membrane en acétate de cellulose de point de coupure de 10 kDa (Sartorius-14539-63-G). Cette dernière est préalablement nettoyée par immersion dans un mélange eau distillée/acétone (50/50) pendant 60 minutes.

II.2 Caractérisation de la laccase purifiée

II.2.1 Dosages protéiques par la méthode à l'acide bicinchoninique (ABC)

Afin de déterminer la concentration en protéines dans l'extrait enzymatique, le kit Bio-Rad Protein Assay est utilisé dans la méthode de dosage à l'acide bicinchoninique. Les avantages de cette méthode sont, d'une part, sa grande sensibilité de mesure (0,6 à 50 µg de protéines / mL), et, d'autre part, son insensibilité à la présence de composés phénoliques ou de polysaccharides.

Son principe se fonde sur le fait que quatre résidus d'acides aminés (la cystéine, la cystine, le tryptophane et la tyrosine) sont capables de réagir avec les cations Cu^{2+} en milieu alcalin, en les réduisant en Cu^{+} . Ces derniers forment un complexe avec l'acide bicinchoninique (ABC), donnant une coloration bleue pourpre avec une absorbance maximale à 562 nm (Slocum & Deupree, 1991).

Mode opératoire :

Les dosages sont réalisés selon la méthode décrite par McMahon, Doyle, Brooks, & O'Connor (2007), modifiée comme décrite ci-dessous.

Une gamme étalon de solutions de sérum albumine bovine (SAB) est préparée à 0, 20, 40, 60, 80 et 100 $\mu\text{g/mL}$. 50 μL de chaque tube est mélangé à 1 mL du réactif ABC. Après incubation à 37°C pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Pour doser les protéines dans la solution enzymatique brute, des dilutions 1:50 et 1:100 sont préparées en milieu tampon phosphate pH 7,5 (50 mM). 50 μL de chaque solution diluée sont prélevés et 1 mL du réactif ABC est ajouté. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, l'absorbance à 562 nm est mesurée et la concentration protéique est déterminée.

II.2.2 Mesure de l'activité enzymatique

L'activité de la laccase est mesurée par spectrophotométrie en suivant la vitesse d'oxydation de la syringaldazine à 525 nm selon la méthode de Mustafa, Muniglia, Rovel, & Girardin (2005). La syringaldazine (I) est un substrat donneur d'électrons spécifique de la laccase. Son oxydation aboutit à une tétraméthoxy-azo-bisméthylènequinone (II) dont l'absorbance maximale est située à 526 nm (le coefficient d'extinction molaire pour le produit d'oxydation ϵ_{526} est de $65000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Mode opératoire :

Dans une cuve en quartz, 400 μL de solution de syringaldazine (0,2 mM dans l'éthanol) sont ajoutés à 1530 μL d'une solution tampon de phosphate de sodium (50 mM ; pH 7,5).

La réaction est déclenchée par addition de 70 μL de préparation enzymatique préalablement diluée au 1:50 dans du tampon phosphate. Après homogénéisation du milieu, la cuve est placée dans un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605 thermostaté à 30°C et la variation de l'absorbance à 526 nm est enregistrée pendant 30 min.

La vitesse initiale (v) est exprimée en μM de produit d'oxydation/min/ μg de protéine. Elle est obtenue par le calcul de la pente de la partie initiale de la courbe de la variation de l'absorbance en fonction du temps.

L'activité enzymatique spécifique est estimée selon l'équation 1 :

$$\text{Equation 1 : } V(\mu\text{mol/min}/\mu\text{g de protéine}) = \frac{V(\text{Abs/min}) \cdot 10^6}{\varepsilon 526 (65000) \cdot \text{quantité de protéine dans l'échantillon } (\mu\text{g})}$$

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'oxydation de 1 μmol de syringaldazine par minute à 30 °C (Mustafa et al., 2005).

II.3 Oxydation enzymatique de composés phénoliques par la laccase

Deux milieux réactionnels sont préparés en parallèle et incubés à 30°C. Le premier milieu réactionnel est composé de 5 mL de solution d'acide férulique (50 mM) et 45 mL de tampon phosphate de sodium (50 mM ; pH 7,5). La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de 13,5 UI/mL de laccase. Le deuxième milieu est un témoin, préparé comme indiqué précédemment mais sans enzyme. Il permet de vérifier si l'acide férulique subit une oxydation chimique par l'oxygène dissous.

La cinétique de l'oxydation de l'acide férulique est suivie pendant 4 heures par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (CLHP), à différents intervalles de temps, par prélèvement de 100 μL dans le milieu réactionnel. La réaction est arrêtée par l'addition de 900 μL de méthanol/ TFA 0,03 % (Lacki & Duvnjak, 1996). Les échantillons sont filtrés à l'aide de membranes Ministar-CR (Cellulose régénérée) (Sartorius, 0,2 μm de porosité) avant d'être analysés.

II.4 Méthodes analytiques de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse

Les analyses sont réalisées sur une chaîne de CLHP de marque Shimadzu ; celle-ci est constituée des éléments suivants : une colonne apolaire (Lichrocart -Purospher RP 18, 250 x 4mm, 5 μm) (Merck), un injecteur automatique (SIL-10ADvp), une pompe (LC-10 ATvp), un détecteur

à barrettes de diodes UV/VIS (SPD-M 10 A_{VP}) et un ordinateur avec logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes (LCsolution).

La phase mobile comporte deux solutions : la solution A, eau distillée à 0,03 % de TFA et la solution B, mélange d'acétonitrile et de solvant A (80:20 ; v/v). La méthode d'élution comporte un gradient de A et B avec un débit de 0,2 ml/min ; le volume d'injection est de 50 µL et la détection est effectuée par un balayage entre 200 et 800 nm. Le gradient d'élution de l'acide férulique est précisé dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Gradient d'élution pour le dosage de l'acide férulique par CLHP

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
15	60	40
20	40	60
35	20	80
50	95	5

Dosage du l'acide férulique :

L'acide férulique est quantifié à son maximum d'absorption ($\lambda = 322\text{nm}$) à l'aide d'une gamme étalon (0,1 à 0,5 mM) préparée dans du méthanol. L'équation de la droite d'étalonnage de l'acide férulique est $y = 10^8 x$ avec $R^2 = 0,999$.

III. Fonctionnalisation enzymatique de la pectine

III.1 Greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine

Les expériences de greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine sont effectuées dans un bécher ouvert, sans limitation d'oxygène.

Deux méthodes sont envisagées : la méthode de greffage direct et l'adsorption indirecte.

Greffage direct

La méthode de greffage direct consiste à ajouter 1 g de pectine LM de citron à 5 mL d'une solution méthanolique d'acide férulique 50 mM et 45 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5) dans un bécher. Le milieu réactionnel est placé au bain-marie à 30 °C et maintenu sous une agitation de 500 rpm tout au long de l'expérience. Pour déclencher la réaction, 13,3 UI/mL de laccase purifiée sont ajoutés et laisser agir pendant 4 h pour obtenir finalement la pectine modifiée, nommée pectine F.

Adsorption indirecte

La méthode d'adsorption indirecte est menée en deux étapes. La première étape consiste à oxyder l'acide férulique (5 mL, 50 mM) par la laccase, dans du tampon phosphate (45 mL, 50 mM) pendant un certain temps, assurant l'oxydation complète de l'acide férulique, pour obtenir les produits d'oxydations de l'acide férulique (POX). Ensuite, 1 g de pectine LM de citron est ajouté aux POX et laissé en contact pendant 4 h, à 30 °C et sous une agitation de 500 rpm ; cette étape permet d'obtenir finalement la pectine POX.

En parallèle, deux témoins sont préparés : le premier contient la même composition du milieu réactionnel mais sans laccase, il sert à mesurer la quantité d'acide férulique s'adsorbant sur la pectine. Le deuxième témoin ne contient pas de substrat phénolique et il sert à mesurer la quantité de laccase adsorbée sur la pectine. Un dernier milieu est préparé sans pectine dans le but de comparer la cinétique enzymatique de l'oxydation en présence et en absence de pectine.

Récupération des poudres de pectine modifiées et conservation :

Après 4h de réaction, les milieux réactionnels sont congelés puis lyophilisés afin de récupérer les pectines modifiées sous forme de poudre. Ces dernières sont ensuite lavées avec 20 mL de chacun des solvants suivants : le méthanol, l'éthanol et l'acétone pour éliminer toutes traces de

composés phénoliques adsorbés par liaisons électrostatiques. Enfin, elles sont séchées à température ambiante et conservées au dessiccateur jusqu'à utilisation.

III.2 Caractérisation structurale des pectines natives et fonctionnalisées

III.2.1 Analyse structurale par spectrométrie UV/visible

Des solutions de 1 g/L de pectine native (témoin) et de pectine fonctionnalisée par les méthodes directe et indirecte (pectine F et pectine POX) sont préparées. Ces solutions sont maintenues sous agitation de 200 rpm et à 25 °C pendant 30 min pour assurer une dissolution maximale. Elles sont ensuite filtrées sur un verre fritté de porosité 8 µm, sous vide, pour garantir l'absence de particules solides de pectine. Un balayage de spectre d'absorbance entre 190 et 900 nm est alors effectué en utilisant un spectrophotomètre UV-visible et en utilisant une cuve en quartz (Shimadzu UV-1605).

III.2.2 Identification des groupements fonctionnels par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier FT-IR

Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) mesure l'absorption des fréquences infrarouges par un échantillon placé dans le trajet d'un faisceau infrarouge. L'objectif principal de l'analyse spectroscopique IR, est d'identifier les groupements chimiques fonctionnels présents dans un échantillon, ce qui aide à déterminer la structure des molécules qui le compose.

Mode opératoire

La pectine native et les pectines fonctionnalisées (pectine F et pectine POX) sont analysées, après lyophilisation pour éliminer au maximum le signal de l'eau. Les analyses par infrarouge (FTIR) sont réalisées avec un appareil Bruker (Tensor 27, FTIR spectromètre) avec une cellule ATR Platinum ayant un cristal diamant mono-réflexion, et équipé d'un détecteur pyroélectrique

DTGS. Quelques milligrammes de chaque échantillon sont placés et comprimés par un poinçon sur la fenêtre en diamant. 128 scans à une fréquence de 10 kHz sont réalisés à 20 °C dans une gamme spectrale allant de 0 à 4000 cm^{-1} .

III.2.3 Analyse de la structure moléculaire par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Principe

Cette technique utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique. Elle sert à déterminer les structures moléculaires.

Le signal d'un proton est caractérisé par son déplacement chimique *delta* (exprimé en ppm), qui dépend essentiellement de la nature de l'atome qui le porte (carbone, azote ou oxygène le plus souvent) et plus généralement de son environnement chimique.

D'autre part, la RMN à deux dimensions (^1H - ^{13}C -) permet de déterminer les positions relatives des protons et des atomes de carbone.

Mode opératoire

Les spectres RMN- ^{13}C et RMN- ^1H sont déterminés à l'aide D'un spectromètre Bruker AVANCE 400 III (champ magnétique : 9.4T, correspondant à une fréquence de résonance proton de 400 MHz) équipé d'une sonde BBFO. Les échantillons de pectine sont dissous dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,5), préparé avec de l'eau deutérée (D_2O) et versé dans un tube de 5 mm de diamètre, à 50 °C. Différents contrôles ont été préparés : pectine laccase, la pectine-FA et de la pectine natif. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (δ).

III.2.4 Caractérisation de la structure des échantillons selon leur masse par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Principe

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier des produits par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe consiste à séparer, en phase gazeuses, des molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), grâce à une source d'ionisation.

Mode opératoire

Les échantillons de pectine prélevés des milieux réactionnels sont dilués au demi dans H₂O:TFA (0,03 %) avant d'être analysés à l'aide d'un système DionexUltiMate 3000-LTQ UHPLC-MS (ThermoFisher Scientific, San José, CA, USA) équipé d'une colonne Alltech Alltima C18 (150 * 2,1 mm ; 5 µm) à 25 °C (débit, 0,2 mL/min). Les composés sont élués pendant 20 minutes avec un gradient linéaire de 5 à 95 % de phase B (acétonitrile contenant HCOOH (0,1%, v / v) dans la phase A (eau contenant du HCOOH (0,1%, v / v)). Les produits sont analysés par ESI-MS en mode positif d'ions MS, à la fois dans le mode MS-analyse complète et en MS₂.

III.3 Propriétés physicochimiques des pectines natives et fonctionnalisées

III.3.1 Mesure de la couleur des échantillons

La mesure de couleur est effectuée en réflectance avec le spectrophotomètre Microflash 200D (Datacolor International, Montreuil). Avant chaque série d'analyse, l'appareil doit être équilibré à l'aide de deux standards, blanc et noir.

Mode opératoire

Pour mesurer la couleur des échantillons, 100 mg de poudre sont placés dans un bécher de 5 mL. Les mesures de L^* , a^* , et b^* sont effectuées directement en plaçant le disque de l'appareil DataColor sur le bécher. Trois mesures sont réalisées par échantillon (1 flash par mesure).

Les résultats sont rapportés dans un espace colorimétrique de représentation des couleurs de surface appelé CIE $L^*a^*b^*$. Dans ce modèle, adopté par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), il existe trois paramètres qui caractérisent les couleurs : L^* , a^* et b^* (Lathasree, Rao, SivaSankar, Sadasivam, & Rengaraj, 2004).

La composante L^* mesure la variation de la luminance. La valeur de L^* varie de 0 % (noir) à 100 % (blanc).

Les composantes a^* et b^* mesurent deux gammes de couleur allant respectivement du vert au rouge et du bleu au jaune, en passant par le gris.

Un autre paramètre qui joue un rôle dans la détermination de la couleur est la saturation, appelée encore chroma C^* . Selon le chroma, la valeur varie de 0 % (insaturé par exemple gris neutre, blanc, noir) à 100% de saturation. Il représente le degré de pureté et d'intensité de la couleur.

III.3.2 Degré d'estérification (DE) par FTIR

Tous les étalons et les échantillons ont été séchés et stockés dans des dessiccateurs avant l'analyse par spectroscopie FTIR (*cf.* partie Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier FT-IR). Une courbe d'étalonnage des pectines commerciales ayant un degré d'estérification connu, est tracé pour déterminer le DE des pectines modifiées. Les DE des pectines F et pectine POX sont calculés en utilisant l'équation 2 d'ajustement linéaire de la courbe d'étalonnage obtenue par corrélation du rapport des aires des groupes carboxyles estérifiés (1750 cm^{-1}) et non estérifiés

(1650 cm⁻¹) des pectines commerciales standards avec leur DE connu correspondant (Chatjigakis et al., 1998 ; Urias-Orona et al., 2010).

Équation 2 : Degré d'estérification (DE) =

$$\frac{\text{Aire de groupes carboxyle estérifiés}}{(\text{Aire de groupes carboxyle estérifiés} + \text{Aire de groupes carboxyle non estérifiés})}$$

III.3.3 Détermination du potentiel zêta et mobilité électrophorétique

Principe

Le potentiel zêta représente la charge d'une particule au niveau du plan de cisaillement (Figure 21). Cette charge de surface permet de prédire les interactions entre les particules en suspension. C'est l'un des paramètres fondamentaux connus pour affecter la stabilité d'une dispersion et la durée de stockage d'une formulation et par suite le temps et le coût de cette formulation (Haeri, Alinaghian, Daeihamed, & Dadashzadeh, 2014).

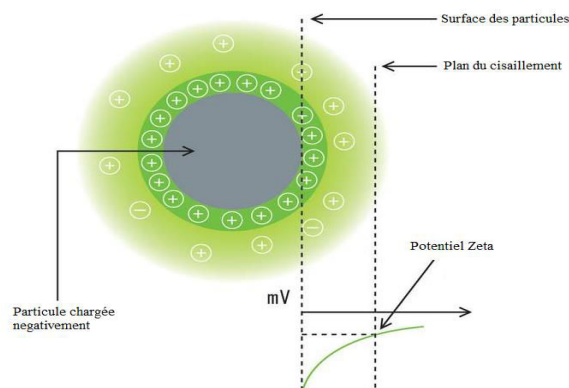


Figure 21 : Le potentiel zêta représente la charge d'une particule au niveau du plan de cisaillement (modifié de www.horiba.com)

Le principe de la mesure est de provoquer la migration des particules d'un échantillon contenues dans la cellule de mesure en appliquant une tension alternative aux deux électrodes. Ensuite, le potentiel zêta approximatif est calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant un modèle, dont le plus courant est celui de Smoluchowski (Hocine, Amiri, Aït-Mokhtar,

& Pantet, 2011; Von Smoluchowski, 1921). Les seuls paramètres nécessaires à la détermination du potentiel zêta sont : la constante diélectrique du liquide, son indice de réfraction et sa viscosité.

Mode opératoire

La mobilité électrophorétique ($\mu\text{M cm/Vs}$) est mesurée afin de déterminer l'efficacité du greffage. Pour la mesure, les échantillons de pectine sont dissous à une concentration de 10 g/L dans l'eau ultrapure (1 % m/v), à pH 3 et puis filtrés avec un filtre 0,45 μm (Ministar-RC membranes, Sartorius) et versé dans une cuve Zêta avant l'analyse. Toutes les mesures sont réalisées à $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ en utilisant un appareil de type Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Angleterre) équipé d'un laser vert (532 nm Type : doublé en fréquence DPSS). Chaque mesure est répétée trois fois avec un minimum de 20 « run » dans chaque répétition et la moyenne des mobilités électrophorétiques est enregistrée.

III.3.4 Détermination de la taille des particules par diffusion statique de la lumière

Principe

La diffusion statique de la lumière mesure les distributions granulométriques des particules allant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs millimètres. Le granulomètre Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, UK), mesure la variation de l'angle de la lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser de type He/Ne qui fonctionne à une longueur d'onde de 632,8 nm, traverse un échantillon de particules dispersées.

Mode opératoire

Les différents polymères de pectine (pectine-N, pectine-F) et chitosane (chitosane-N, chitosane-F) sont préparés à une concentration de 0,15 % (m/v) respectivement dans l'eau pure et l'acide acétique 0,06 % (v/v). Le pH des solutions est ajusté à 4,5 par une solution de NaOH 0,1 M et les solutions sont centrifugées pour éliminer les particules insolubles.

III.3.5 Analyse de la surface des échantillons par microscopie électronique à balayage

Principe

La Microscopie électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau d'électrons finement focalisé qui balaie la surface de l'échantillon afin de produire une image à haute résolution de cet échantillon. Les Images de MEB ont un aspect en trois dimensions, ce qui est très utile lorsque l'on examine la structure de surface d'un échantillon.

Mode opératoire

La microscopie électronique à balayage (Hitachi SEM S4800) à 10 kV est utilisée afin d'étudier la surface des particules de pectine natives et fonctionnalisées. Les poudres de pectines sont lyophilisées et stockées dans un dessiccateur avant la mesure. La préparation des échantillons se fait par une dispersion des pectines dans 5 mL d'éthanol 70 %, suivie d'une sonication toutes les 2 s pendant 5 min avec une puissance de 30 % et une fréquence de 35 KHz. Ensuite quelques gouttes sont déposées sur un support puis elles sont séchées à l'air libre pendant deux heures avant de les soumettre à une carbonisation sous vide. La mesure est réalisée pour différentes magnifications (150x, 300x, 1000x et 2500x).

III.3.6 Dosage des composés phénoliques greffés sur les pectines fonctionnalisées.

Le dosage des phénols est réalisé selon la méthode décrite par Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999 avec des modifications mineures. Après 4 h de réaction enzymatique, les pectines fonctionnalisées sont récupérées et lyophilisées. Elles sont ensuite lavées avec 20 ml de chacun des solvants suivants : méthanol, éthanol et acétone afin d'éliminer les phénols faiblement adsorbés. Enfin, la poudre recueillie est séchée pendant 24 h avant qu'elle ne soit utilisée pour quantifier les phénols greffés.

Des solutions (1mg/mL) de pectine native, pectine-F et pectine-POX sont préparées dans de l'eau distillée. Ensuite, 1 mL de chaque solution est mélangé avec 1 mL de carbonate de sodium à

10 % (Na_2CO_3). Les mélanges obtenus sont incubés pendant 10 min à 37 °C. 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au tiers est ajouté et les solutions obtenues sont agitées quelques secondes à 300 rpm puis elles sont gardées pendant 30 min, à l'abri de la lumière et à 25 °C, avant que l'absorbance soit mesurée à 760 nm (Shimadzu UV-1605). Une solution aqueuse d'acide gallique (5-40 $\mu\text{g/mL}$) et l'eau distillée sont utilisées comme standard et blanc, respectivement. La teneur en composés phénoliques est déterminée d'après la courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Équation 3 : $y = 0,01 \times x$ ($R^2=0,9997$)

Où, y est la valeur de l'absorbance à 760 nm et x la concentration du phénol greffé exprimée mg/L.

IV. Propriétés thermiques

La dénaturation thermique des poudres de pectine native et modifiée (pectine F et pectine POX) est également analysée par calorimétrie différentielle à balayage ou en anglais « Dynamic Scanning Calorimetry » (DSC).

Principe

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique d'analyse thermique qui est basée sur la différence d'énergie entre la référence et l'échantillon pendant le chauffage, le refroidissement ou l'isotherme. La capsule de référence est en aluminium et elle contient de l'air. Les analyses sont effectuées sous un gaz inerte comme l'azote pour empêcher toute réaction de la substance à étudier avec l'atmosphère du four. Cette technique donne des résultats sous forme de pics. Sur la base de la différence dans les énergies entre référence et échantillon, la DSC fournit l'enthalpie de la réaction. Une valeur positive de l'enthalpie indique une réaction exothermique, une valeur négative indique que la réaction est endothermique. La courbe d'analyse thermique (Figure 22) obtenue par la DSC permet de déterminer les phénomènes de transition vitreuse, de fusion, de cristallisation, et de la combustion (Gill, Moghadam, & Ranjbar, 2010).

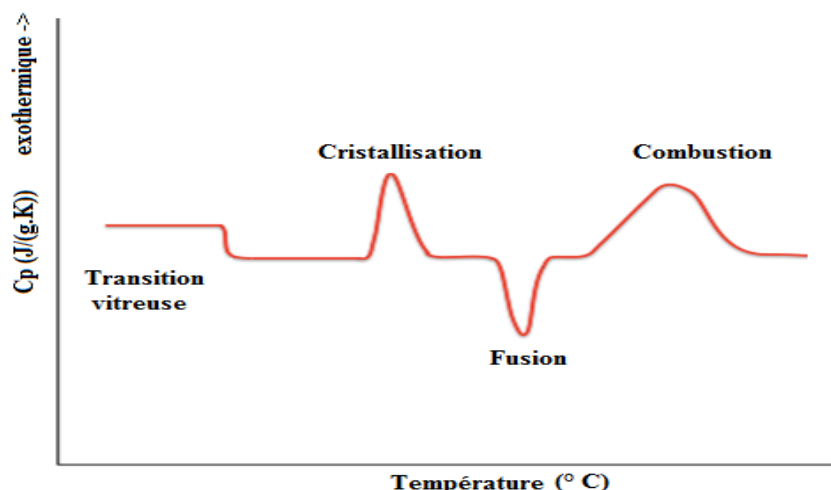


Figure 22: Exemple de thermogramme obtenu par DSC (modifié de <http://www.netzsch-thermal-analysis.com>)

Mode opératoire

Les thermogrammes obtenus sur les poudres de pectine native et modifiées (pectine F et pectine POX) sont étudiés par une NETZSCH DSC 204 F1 Phoenix (Allemagne).

9-10 mg de poudres sont pesés et hermétiquement fermés dans des capsules en aluminium de 1 cm³ (Hastelloy C276, France). La capsule de référence ne contient que de l'air. Après équilibrage pendant 10 minutes à 0 °C, la température augmente à 200 °C à une vitesse de 5 °C/min. Une fois la température de 200 °C atteinte, une rampe de refroidissement est mise en place jusqu'à 0 °C à une vitesse de 10 °C/min. Une deuxième montée en température est réalisée jusqu'à 300 °C à une vitesse de 5 °C/min pour observer les faibles phénomènes thermiques pouvant être masqués par l'eau (Iijima, Nakamura, Hatakeyama, & Hatakeyama, 2000). De plus, les températures de dénaturation (TD) ont été déterminées à partir de l'intégration des thermogrammes calorimétriques.

V. Propriétés hygroscopiques

La Sorption Dynamique de Vapeur (en anglais DVS) est une technique gravimétrique pour la mesure des isothermes de sorption d'eau des poudres. La compréhension des effets de la teneur

en eau sur la structure des échantillons et leurs propriétés, est essentielle pour le stockage et l'utilisation des matériaux, tels que les produits agro-alimentaires et pharmaceutiques. La mesure des isothermes de sorption d'eau est une technique de caractérisation fondamentale dans beaucoup de ces domaines.

Principe

Les mesures sont généralement effectuées à une pression constante de 1 bar et avec un débit total de gaz à 200, afin de minimiser les variations du poids associées à la force d'Archimède et la force de trainée. L'utilisation d'une température fixe à 25 °C permet d'obtenir la courbe isotherme de sorption par l'équilibration de l'échantillon sous une série de concentrations de vapeur.

Mode opératoire

L'appareil DVS (Surface Measurement Systems, Londres, Royaume-Uni), équipé d'une microbalance Cahn, surveille les changements de la masse de l'échantillon avec le temps, à 25 °C aux différentes valeurs d'activité de l'eau (a_w) (entre 0 et 0,9). 70-80 mg de l'échantillon est chargé sur le plateau de l'échantillon en quartz. Le programme fixe initialement l' a_w à 0 pendant 6 h (phase de séchage). Cette étape permet à l'activité de l'eau de l'échantillon de diminuer à zéro. L'échantillon est ensuite soumis à des étapes successives d'augmentation d' a_w , de 0,1 à 0,9. Pour chaque étape, les changements de masse (m) et le taux de changements de masse (dm / dt) sont déterminées et tracés en fonction du temps. L'équilibre est considéré comme atteint lorsque des changements dans la masse avec le temps (dm / dt) sont inférieure à 0,001 % / mm (est 1 g d'eau / 100 g matière sèche/ jour). Toutes les expériences sont effectuées à 25 °C en triple pour chaque échantillon. La précision de ce système est de $\pm 1,0$ % HR et $\pm 0,2$ °C.

VI. Etude des propriétés rhéologiques

La rhéologie est la science qui étudie et décrit l'écoulement, la déformation et la rupture d'un corps sous l'effet d'une contrainte. La mesure des propriétés rhéologiques des produits alimentaires permet de prévoir leur comportement mécanique au cours des différentes étapes de l'élaboration de l'aliment, ainsi que pendant l'évaluation sensorielle de sa texture. Les tests rhéologiques sont nombreux tels que la détermination du comportement de la substance (Newtonien, pseudoplastic, thixotrope...), le caractère gélifiant ou non gélifiant de la substance, le point de gélification...

VI.1 Viscosité

Afin de caractériser le comportement d'écoulement, les poudres de pectine native et modifiées par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique (pectine-F et pectine-POX), sont dissoutes dans l'eau ultrapure à 1 % (m/v) à 120 rpm/h. La variation de la viscosité de ces solutions en fonction du cisaillement est mesurée à 25 °C en utilisant un rhéomètre rotatif de marque Kinexus (Malvern Instruments, KNX 2100, UK) avec une géométrie cône/plan (diamètre 50 mm, angle 2°). La température est contrôlée par un système à effet Peltier et l'échantillon est recouvert par un capot pour éviter l'évaporation.

Une rampe du taux de cisaillement de 0,001 à 100 s⁻¹ est aussi réalisée aux échantillons de différentes concentrations (10-50 mg/mL) à 25 °C afin d'étudier l'effet de la variation de la concentration sur la viscosité des solutions de pectines.

VI.2 Gélification

Des solutions de 20 g/L de pectine native et modifiées (pectine F et pectine POX) sont préparées dans 0,1 M de NaCl afin de faciliter la dispersion. Le pH est ajusté à une valeur de 6,5 +/- 0,2. Elles sont ensuite mélangées avec un certain volume de CaCl₂ qui correspond à $R = 2[Ca^{2+}]/[COO^-] = 0,58$ (Capel, Nicolai, Durand, Boulenguer, & Langendorff, 2006).

Les solutions sont immédiatement transférées sur la plaque du rhéomètre. Ensuite, la variation des modules visqueux (G'') et élastique (G') sont suivis à une fréquence de 1 Hz et 0,1 % de cisaillement pour déterminer la température de gélification des échantillons. La fréquence est préalablement déterminée suite à un balayage de fréquence de 0,01 à 100 Hz. Ainsi que le taux de cisaillement est déterminé en faisant un balayage de 0,0001 à 10 % et les valeurs de fréquence et cisaillement choisies sont dans le domaine linéaire.

VII. Propriétés antiradicalaires

Comme il n'y a pas une méthode universelle pour déterminer le pouvoir antioxydant d'une molécule, il faut combiner les réponses de différents tests pour avoir une indication de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester. Dans cette étude, deux méthodes chimiques ont été mises en œuvre, reposant sur le piégeage des radicaux DPPH $\cdot$ et ABTS $^{+\cdot}$. La capacité des molécules d'intérêt à inhiber ces radicaux est évaluée et donne une indication de leur pouvoir antioxydant (Frankel & Meyer, 2000).

VII.1 Piégeage des radicaux DPPH $\cdot$

Principe

Le pouvoir antiradicalaire d'une substance est déterminé par mesure colorimétrique en utilisant le radical 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl appelé DPPH $\cdot$ qui présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de cette coloration suivie à 517 nm.

Mode opératoire

La capacité des échantillons à piéger le radical DPPH $\cdot$ est mesurée selon la méthode modifiée de Guo et al., 2015. Une solution de DPPH $\cdot$ ($6 \cdot 10^{-5}$ M) est fraîchement préparée dans du méthanol pur ; les échantillons (0,5 à 2,5 g) sont ajoutés dans une cuve remplie de cette solution de DPPH $\cdot$.

Les mélanges obtenus sont agités et incubés pendant 30 min, à température ambiante, à l'abri de la lumière.

L'absorbance des échantillons est mesurée à 517 nm (spectrophotomètre Shimadzu UV-1605) contre un blanc constitué de méthanol pur. Enfin, l'activité antiradicalaire (pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH[•]) des composés testés est évaluée par rapport à une solution méthanolique de radicaux DPPH[•] selon l'équation 4 :

$$\text{Équation 4 : } (\%) \text{ d'inhibition DPPH}^{\bullet} = 1 - \left(\frac{\text{Abs molécules à tester}}{\text{Abs 100 \% DPPH}} \right) \times 100$$

Abs molécules à tester : absorbance de la solution des molécules à tester en présence des radicaux DPPH[•]; Abs 100 % DPPH : absorbance de la solution contenant uniquement la solution de radicaux DPPH[•].

L'activité antiradicalaire a été exprimée en valeur IC₅₀, qui correspond à la concentration (g/L) de molécule testée nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH[•]. Plus cette valeur est faible, plus la capacité antioxydante de la molécule testée est grande.

VII.2 Piégeage des radicaux ABTS^{•+}

Principe

La méthode ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) est basée sur la désactivation du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant. L'activité antiradicalaire d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber les radicaux ABTS ^{•+}. Ces derniers sont générés par l'oxydation incomplète de l'ABTS par le persulfate de potassium. Cette réaction s'accompagne de l'apparition d'une coloration bleue intense. Au contact d'un composé donneur d'hydrogène, les radicaux disparaissent au profit des ions ABTS⁺, conduisant à la décoloration de la solution (Lien, Ren, Bui, & Wang, 1999). Cette décoloration est suivie par spectrophotométrie à 734 nm selon la méthode de Re et al., 1999.

Mode opératoire

Une solution d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium (2,45 mM) sont préparées dans l'eau distillée. Les deux solutions sont ensuite mélangées (1: 1 ; v:v) et maintenues à l'obscurité pendant 24 h. Il en résulte l'apparition d'une coloration bleue intense. La solution d'ABTS^{•+} ainsi obtenue est diluée afin d'obtenir une densité optique à 734 nm de l'ordre de 0,682 ± 0,02. Des solutions aqueuses de pectine native et des pectines fonctionnalisées (pectine-F et pectine-POX), sont préparées à différentes concentrations (5-20 g/L). Ensuite, 10 µL de ces solutions sont ajoutés à 1 mL de solution d'ABTS^{•+}. Après 15 min d'incubation à 30 °C, l'absorbance est mesurée à 734 nm (Re et al., 1999). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition des radicaux ABTS^{•+} selon la formule suivante (Équation 5)

$$\text{Équation 5 : (\% d'inhibition ABTS}^{\bullet+} = 1 - \left(\frac{\text{Abs finale}}{\text{Abs initiale}} \right) * 100$$

Abs initiale : absorbance de la solution d'ABTS^{•+} - Abs finale : absorbance de la solution d'ABTS^{•+} en présence de la molécule testée.

Comme précédemment, l'activité antiradicalaire des composés testés est exprimée en valeurs de IC₅₀.

VIII. Auto-assemblage et encapsulation

Afin d'étudier l'efficacité de la fonctionnalisation enzymatique des polysaccharides, deux approches à des fins applicatives ont été étudiées : l'auto-assemblage et l'encapsulation.

VIII.1 Auto-assemblage

L'auto-assemblage de deux polysaccharides (les pectines et le chitosane) est réalisé dans un milieu aqueux dans le but de former des microparticules. La formation d'un complexe pectine-chitosane est le résultat d'une interaction entre les groupements amines (NH_3^+) du chitosane ayant un pKa de 6,3 et les groupements carboxyles (COO^-) de la pectine ayant un pKa de 1,99 (Figure 23). Ce qui indique que la réaction doit prendre place dans un milieu acide, à pH supérieur au pKa des COO^- et inférieur au pKa des NH_3^+ . Dans de tels assemblages, il y a plusieurs facteurs à contrôler comme la température, le ratio pectine / chitosane, la concentration des polymères, la vitesse d'agitation, le temps d'assemblage...

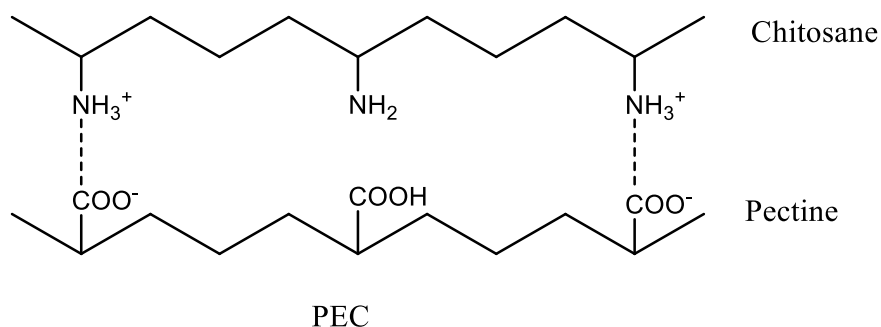


Figure 23: Représentation du complexe « polyélectrolyte » entre la pectine et le chitosane

VIII.1.1 Préparation des assemblages

Afin de former des microparticules bien structurées, monodisperses et stables, plusieurs paramètres sont contrôlés dans la préparation des quatre assemblages :

- pectine native-chitosane natif;
- pectine native-chitosane fonctionnalisé;

- pectine fonctionnalisée-chitosane natif;
- pectine fonctionnalisée-chitosane fonctionnalisé.

Après une solubilisation de la pectine et du chitosane pendant 24 h à des concentrations variant de 0,05 à 0,15 %, les polymères sont filtrés sous vide avec un filtre de cellulose de 8 μ m de porosité et leur pH est ajusté à 4,5 avec quelques gouttes de NaOH 0,1 M.

Les polymères sont ensuite mélangés dans un bécher mis sous agitation (de 500 à 900 rpm), à une température bien définie (4, 25, 70 °C) en ajoutant la pectine dans le chitosane suivant un ratio pectine / chitosane bien déterminé (de 1/1 à 6/1). Le temps d'assemblage varie de 10 à 90 min.

VIII.1.2 Influence des paramètres sur la distribution des microparticules

Cette partie porte sur l'influence des conditions de préparation, sur la taille et la distribution des microparticules. L'assemblage concerné dans cette étude est celui de pectine native / chitosane natif. Les conditions étudiées sont :

- la concentration en acide acétique ;
- la température ;
- la vitesse d'agitation ;
- le temps réactionnel ;
- les concentrations des polysaccharides.

Le Tableau 6 est un récapitulatif des conditions fixes et variables. Sachant que l'ordre d'ajout des polymères est toujours le même : la pectine est ajoutée au chitosane ; et le pH est ajusté à 4,5.

Tableau 6 : Résumé des conditions fixes et variables utilisées dans la préparation des microparticules de pectine native/chitosane natif

Conditions variables \ Conditions fixes	Temps réactionnel (min)	Vitesse d'agitation (rpm)	Concentration en acide acétique (% v/v)	Température (°C)	Concentration des polymères (% m/v)	Ratio volumique (pectine : chitosane)
Concentration en acide acétique %	60	600	0,06-0,1-1	25	0,1	2/1
Température	60	600	0,06	4- 25- 70	0,1	2/1
Vitesse d'agitation	60	500 à 900	0,06	25	0,1	2/1
Temps réactionnel	10-30-60	600	0,06	25	0,05	1/1
Concentration des polymères (% m/v)	60	600	0,06	25	0,05 à 0.25	2/1

A la fin de la préparation des assemblages dans ces conditions, une mesure de la taille est menée pour voir l'effet de la procédure sur la taille des microparticules formées. Ce qui permet de choisir les meilleures conditions à utiliser pour préparer des microparticules de petite taille (centaines de micromètres) et d'y encapsuler une molécule active.

VIII.2 Encapsulation

Afin de vérifier l'impact de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine et du chitosane, une étude est menée sur ces deux polymères fonctionnalisés pour mesurer l'influence de la modification sur l'efficacité de l'encapsulation d'un principe actif hydrophobe par rapport aux polymères natifs.

La curcumine, un antioxydant liposoluble, présentant des propriétés de fluorescence et une absorption sensible aux solvants et aux milieux (Sharma, Saraogi, & Kumar, 2015), est utilisée comme principe actif pour l'encapsulation.

La pectine et le chitosane natifs et fonctionnalisés formant quatre combinaisons sont utilisés pour l'assemblage et l'encapsulation : pectine N - chitosane N, pectine N - chitosane F ; pectine F - chitosane N ; pectine F - chitosane F.

La première étape consiste à déterminer les ratios volumiques des assemblages pectine / chitosane des 4 combinaisons déjà citées. Pour maximiser les interactions entre la pectine chargée négativement et le chitosane chargé positivement, le ratio choisi doit conduire le plus possible à la neutralité (égalité de charges).

La température est fixée à 25 °C et le pH des solutions à 4,5 pour garantir l'ionisation des polymères. Une solution de curcumine à 20 mg/mL est préparée dans de l'éthanol et conservée à 4 °C jusqu'à utilisation, à l'abri de l'air et de la lumière pour en prévenir l'oxydation (Lee et al., 2013). Ensuite, 12 mL de biopolymères 0,15 % (m/v) (Tableau 7) sont préparés selon le ratio volumique pectine / chitosane assurant leur neutralité (Cf chapitre 4 de la partie résultats et discussion).

Tableau 7: Les volumes des biopolymères utilisés dans la préparation des assemblages pectine : chitosane

	Volume de pectine (mL)	Volume de chitosane (mL)
Pectine native : chitosane natif	8,0	4,0
Pectine fonctionnalisée : chitosane natif	10,2	1,7
Pectine native : chitosane fonctionnalisé	6,0	6,0
Pectine fonctionnalisée : chitosane fonctionnalisé	8,0	4,0

Le protocole d'encapsulation suivi est montré dans la Figure 24. Pour résumer, 1 mL de curcumine à 20 mg/mL est ajouté au volume de chitosane 0,15 % en agitant à 600 rpm pendant 5 min avant que la pectine à 0,15 % soit ajoutée et mélangée sous une vitesse de 600 rpm pendant 1h. Ensuite, un aliquote de 2 mL est prélevé dans un tube eppendorf et centrifugé à 13400 rpm dans une centrifugeuse MiniSpin eppendorf pour 2 min pour doser le taux de curcumine encapsulée (dans le culot) et libre (surnageant 1).

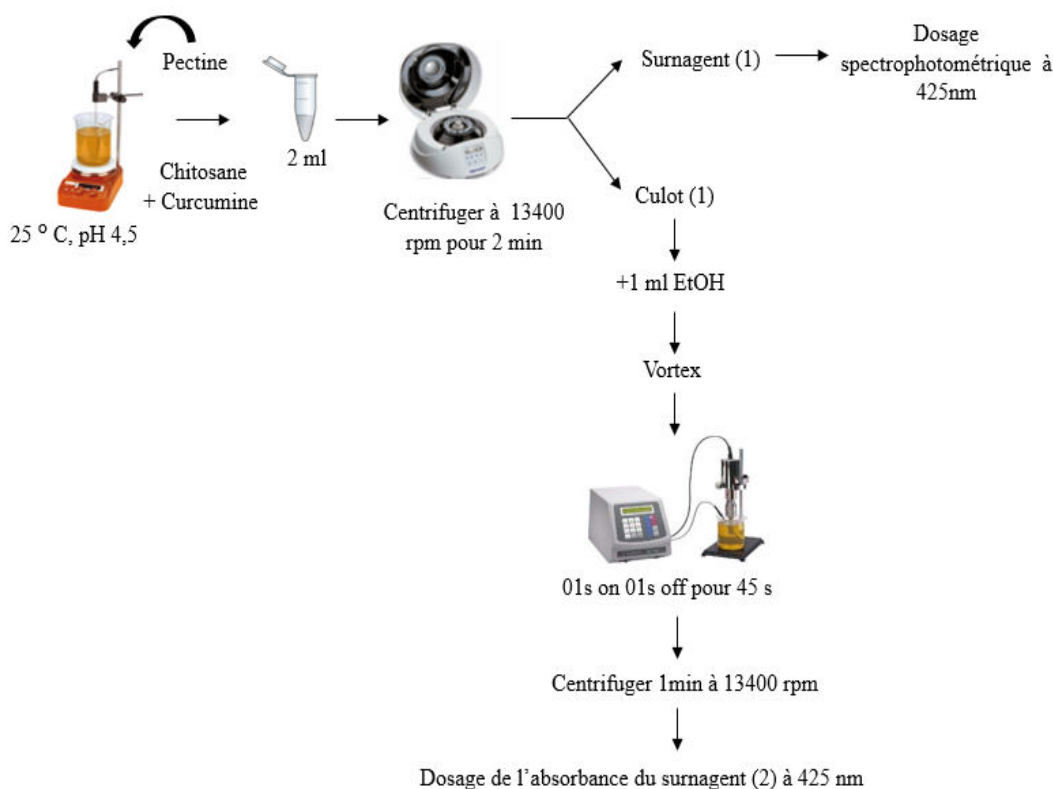


Figure 24: Protocole de l'encapsulation de la curcumine dans un mélange de polyélectrolytes composé de pectine et de chitosane

VIII.2.1 Dosage du curcumine

Le dosage du curcumine se fait en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605 à 425 nm correspondant à l'absorbance maximale de la curcumine (Sharma et al., 2015). Pour déterminer le pourcentage de curcumine encapsulée, 1 mL d'éthanol est ajouté au culot puis ce dernier est resuspendu au vortex, ensuite il faut procéder à une sonication 1 s « on » 1 s « off » pendant 45 s, suivie d'une centrifugation pendant 1 min à 13400 rpm. Le surnageant contenant la curcumine libérée des microparticules est dosé en utilisant le spectrophotomètre UV à 425 nm.

Ainsi en suivant ce protocole de la Figure 24, le taux de la curcumine encapsulée dans les microparticules pectine / chitosane est dosé dans le culot. Par la suite, il est possible de comparer l'efficacité d'encapsulation de la curcumine dans les quatre combinaisons d'assemblage des polysaccharides natifs et fonctionnalisés.

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

I. Chapitre I : Fonctionnalisation de la pectine par des composés phénoliques, catalysée par la laccase de *Myceliophthora thermophila* en milieu aqueux

I.1 Introduction

La pectine est un polysaccharide très intéressant dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, de part ses propriétés techno-fonctionnelles. Toutefois ce polymère présente des inconvénients qui limitent son utilisation tels que la difficulté d'hydratation dans l'eau due à la formation de vacuole, le gonflement suite à une hydratation rapide, le caractère très hydrophile qui limite la possibilité de contrôler le relargage efficace d'un principe actif (Chen et al., 2015). Ainsi, des études sont faites afin de surmonter ces limitations et d'apporter de nouvelles propriétés fonctionnelles à ce polymère ou d'améliorer celles existantes. Ces études se sont orientées vers la fonctionnalisation de la pectine par voie enzymatique (Abang & Meyer Anne, 2013; Jung & Wicker, 2012; Zaidel, Chronakis, & Meyer, 2012).

Le travail proposé dans cette étude repose sur la mise en œuvre d'un procédé enzymatique d'oxydation de l'acide férulique catalysée par la laccase de *Myceliophthora thermophila*, en présence de pectine. L'avantage de ce procédé est la formation d'intermédiaire semi-quinoniques réactifs pouvant réagir avec les groupements fonctionnels présents sur la pectine, conduisant ainsi au greffage de composés phénoliques sur la structure du polymère. La faisabilité de cette approche a été démontrée avec le chitosane dans des travaux antérieurs menés au sein du laboratoire. L'objectif de ce travail est d'étendre l'étude à un polymère alimentaire, la pectine, en vue de créer de nouveaux ingrédients fonctionnels. Plusieurs articles rapportent l'utilisation de polyphénol oxydases pour réticuler la pectine grâce à l'oxydation de l'acide férulique naturellement présent dans sa structure (Abang & Meyer Anne, 2013; Littoz & McClements, 2008). Cependant, à notre

connaissance, aucune étude n'a été menée sur le greffage exogène de composés phénoliques sur la pectine.

Les principales questions scientifiques relatives à cette étude sont les suivantes : est-il possible d'établir des liaisons entre les composés issus de l'oxydation de l'acide férulique et les groupements fonctionnels de la pectine. Si oui, de quelle nature sont les liaisons établies et où celles-ci sont-elles localisées dans le polymère ?

Pour tenter de répondre à ces questions, l'article qui suit présente les travaux réalisés pour montrer la faisabilité de la réaction. Par ailleurs, la cinétique réactionnelle a été établie et le taux d'incorporation de composés phénoliques dans la pectine a été déterminé. Les modifications structurales engendrées par la fonctionnalisation du polymère ont été étudiées par des méthodes spectroscopiques et de diffusion de la lumière.

I.2 Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid

N. Karaki¹, A. Aljawish¹, L. Muniglia¹, S. Bouguet-Bonnet², S. Leclerc², J. Jasniewski¹, C. Humeau-Virot*

¹Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602, F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France

²Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), UMR 7036, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France.

* Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602, F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

*Corresponding author: catherine.humeau@univ-lorraine.fr

Article soumis dans “Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic”

Abstract

Pectin is a natural biopolymer extracted mostly from citrus peel, sugar beet and apple pomace. In order to improve its functional properties and then to enlarge the field of its potential applications, functionalization reaction of citrus pectin with ferulic acid (FA)-oxidation products was performed in aqueous medium, at 30 °C and pH 7.5, in the presence of *Myceliophthora thermophila* laccase as biocatalyst. The conjugation between FA-oxidation products and pectin was confirmed using FTIR, UV-Vis and LC-MS analyses. The obtained results suggested that covalent bonds were between the pectin carboxyl groups and FA-oxidation products between the pectin carboxyl groups and FA-oxidation products. The determination of the total phenolic content showed that the modified pectin contained 5 times more phenols than the native pectin. In view of these results, this enzymatic procedure appears as a promising way to provide new pectin-based polymers that are expected to present new properties of interest.

Keywords: phenols, pectin, laccase, oxidation, antioxidant.

Highlights

- The functionalization of pectin with phenols was performed under mild conditions.
- The ferulic acid oxidation products were grafted onto pectin thanks to laccase catalysis
- Covalent bonds were between the pectin carboxyl groups and FA-oxidation products.

I. Introduction

Pectin is a natural polysaccharide, used in many industrial fields such as pharmaceutical [1,2], medical [3], and food industries [4]. This biopolymer found in higher plants cell walls, is mainly composed of homogalacturonan (HG), which is a linear backbone of (1→4)-linked α -D-galacturonic acid units. These latter units can be methyl-esterified of its carboxyl groups and/or acetylated on its C-2 hydroxyl groups [5]. The homogalacturonic regions are interrupted by rhamnogalacturonic (RG-I) regions, that consist of galacturonic acid/rhamnose repeating units, and rhamnogalacturonic-II (RG-II) regions made of a homogalacturonic backbone with complex side chains containing rhamnose and other neutral sugars [6]. Generally, the main feedstocks for commercial pectin production around the world are apple pomace and citrus peel.

Pectin behavior within the cell walls as well as pectin properties after extraction, strongly depends on its methylation and acetylation degree showing strong structure-property relationship [7]. Citrus pectin is not acetylated contrary to sugar beet pectin which secondary hydroxyl groups are highly acetylated [8,9]. Depending on the degree of methylation (DM), pectin is divided into high methoxy (HM) pectin with DM > 50% and low methoxy (LM) pectin with DM < 50%. The DM determines the functional properties of pectin, which are the base of its broad use [10].

Beside its interesting properties, some limitations related to the use of pectin were reported, such as the formation of lumps during its dissolution in water [11], its highly hydrophilic nature reducing the ability to control drug release in different dosage forms, and its swelling behavior [12]. Many studies showed that the properties of polysaccharides can be improved by modifying their structures, based on the chemical reactivity of their functional groups [13]. These structural modifications can be brought by either chemical or enzymatic processes, those latter being preferred due to less environmental impact, mild conditions and high selectivity [14].

The functional groups of the pectin are mainly the hydroxyl and the carboxyl functions that may be involved in enzymatic reactions, such as esterification and acylation. Furthermore, depending on the source, pectin structure contains variable level of ferulic acid units. Feruloylated pectin is taxonomically widespread but it is of low abundance [15]. Some studies reported the enzymatic cross-linking of sugar beet pectin that contains naturally about 50–60 % of ferulic acid [16–19].

The aim of this study was to apply a laccase-mediated bioprocess for the grafting of exogenous phenolic compounds onto citrus pectin structure [20]. As far as we know, no similar study has been carried out. The laccase of *Myceliophthora thermophila* was used to initiate the oxidation of ferulic acid. The reaction was performed in aqueous medium, in mild conditions (30 °C and pH 7.5), and in the presence of pectin. This single-step and eco-friendly procedure was expected to provide new ingredients with improved properties for food industry.

II. Materials and methods

II.1 Materials and enzyme

Citrus pectin with more than 75% galacturonic acid, ferulic acid (FA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma–Aldrich (France). Acetic acid were purchased from Merck (Germany) and Prolabo (France), respectively. Syringaldazine was purchased from Fluka (France). The following chemicals: acetone, methanol, ethanol, 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS), and acetonitrile were obtained from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA).

In this study, an industrial laccase named Suberase[®] (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) was used. The Suberase[®] is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila* produced by

submerged fermentation of modified *Aspergillus orizae* strain; it belongs to the polyphenol oxidase family.

II.2 Enzymatic reactions

II.2.1 Enzymatic functionalization of pectin

A reaction mixture (solution I) was prepared in a magnetic stirred reactor (500 rpm) by mixing 5 mL of a FA solution (50 mM, in methanol), 45 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and 1 g of pectin. The medium was incubated at 30 °C, under atmospheric conditions (the dissolved oxygen was not limited). The reaction was started by adding 0.75 mL of Suberase[®] (13.5 U/mL of laccase of *Myceliophthora thermophila*). Additionally, three control solutions were prepared in the same conditions: solution (II), solution (III) and solution (IV) having the same composition of the solution I, except for the pectin, the laccase or the substrate FA, respectively. After the complete consumption of FA, the reaction medium was kept in the freezer for 24 h, then freeze-drying was carried out for 72 h. After that, the powder was submitted to an extraction with methanol in a soxhlet apparatus for three hours, and then washed again with organic solvents (ethanol and acetone) to remove unbounded phenols that could be adsorbed onto pectin through electrostatic interactions. Finally, the powder was kept in a desiccator until use.

II.2.2 Enzymatic functionalization of galacturonic acid and galactose

Reactions were performed with galacturonic or galactose instead of pectin, according to the same protocol described before. After four hours of reaction, an aliquot was taken from the reaction medium and analyzed by LC-MS.

Galactose was used because of the similarity of his structure with that of galacturonic acid, missing only the carboxyl group.

II.3 Monitoring reaction kinetics

FA consumption was monitored by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses. 0.1 mL samples were withdrawn from the reaction mixture at various interval times and 0.9 mL of methanol (0.03 % trifluoroacetic acid (TFA), v/v) were immediately added in order to stop the reaction [21,22]. Analyses were performed on a Shimadzu Class-VP HPLC system with a computer controlled system containing upgraded Class-VP 6.1 software. Separations were carried out on a reversed phase column LiChroCART RP-18 (Merck, 25 cm x 0.4 cm, particle size 5 μ m). The detection was conducted between 190 nm and 700 nm on a multichannel photodiode- array detector (SPD-M10A VP). The elution was performed using a gradient of solvent A: water/ TFA (100:0.03, v/v) and solvent B: acetonitrile /water/ TFA (80:20:0.03, v/v/v) at a flow rate of 0.2 mL/min. The gradient steps were as follows: linear gradient from 5 % to 40 % of B during 15 min, from 40 % to 60 % of B during 5 min and from 60 % to 80 % of B during 15 min [23]. The samples were filtered with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 μ m) before analysis. Each analysis was performed in triplicate.

II.4 Characterization of native and modified pectin

II.4.1 Determination of phenolic content

Total phenolic content of native and modified pectin samples was determined by spectrophotometry according to the Folin & Ciocalteu method described by [24,25] with slight modification. Briefly, 1 mL of the pectin samples (1 g/L) was mixed with 1 mL of sodium carbonate (100 g/L) and kept at 37 °C for 10 min. Later on, 1 mL of Folin & Ciocalteu reagent was added. The mixture was then stirred for 30 min in the dark, at room temperature. After that, the absorbance was measured at 760 nm using a UV–visible spectrophotometer (Shimadzu UV- 1605) against a

benchmark. The measurements were compared to a gallic acid standard curve (0 to 60 mg/L; $y=0.01x$; $R^2 = 0.9997$). All analyses were performed in triplicate.

II.4.2 Determination of electrophoretic mobility

Electrophoretic mobility measurements were performed with a Zetasizer Nano ZS (Malvern, England) equipped with a 532 nm frequency doubled DPSS laser, a measurement cell, a photomultiplier and a correlator. Scattering intensity was measured at a scattering angle of 173° relative to the source using an avalanche of photodiode detector. The software used to collect and analyze the data was the Zetasizer Software version 7.11 from Malvern.

10 mg/ml of native and modified pectin samples were dissolved in deionized water at pH 4.5 and then carefully filtered with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity $0.2\mu\text{m}$) before analysis. Samples were measured in a clear disposable Zeta cell (DTS1070 Malvern). The measurements were made at a position of 2.00 mm from the cuvette with an automatic attenuator and at a controlled temperature of $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. For each sample, 15 runs of 15 s were performed with three repetitions.

II.5 Structural characterization

Analyses were performed on native and modified pectins in order to study the structural modifications affected by the grafting of FA oxidation products. .

II.5.1 UV-visible analyses

UV/visible analyses were performed using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1605) scanning in the range 200–600 nm. Pectin samples were dissolved in water (0.5 %, w/v), and then filtered slowly with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity $0.2\mu\text{m}$).

II.5.2 FTIR analyses

Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses were performed using a Tensor 27 (Bruker, Germany) with 128 scans, 10 kHz scanning, in the range 400–4000 cm^{-1} . A DTGS detector was used. Before analysis, the samples were kept out from light and dried for 24 h at room temperature in a desiccator. The dried powders was then placed on a universal diamond ATR top-plate to be analyzed.

The esterification degree (DE) of native and modified pectins was defined as the percentage of carboxylic groups that are esterified. As citrus pectin is not acetylated, the determination of the DE can be performed using FTIR method with no overestimation of the esterification degree [26]. Using the second derivative analysis, DE was determined from the area of the C=O elongation bands of carboxylate groups and ester groups in the region 1750–1540 cm^{-1} [27].

II.5.3 NMR analyses

In order to further analyze the structures, NMR spectroscopy was performed with a Bruker AVANCE III 400 (Magnetic field: 9.4T, corresponding to a 400 MHz proton resonance frequency) equipped with a BBFO probe. ^1H spectra were acquired with a water suppression procedure using the following parameters: 1024 scans, 32768 data points, 16 ppm spectral width and 2 seconds relaxation delay. Proton- decoupled ^{13}C spectra were acquired using a Waltz16 decoupling scheme and with the following parameters: 10240 scans, 65536 data points, 240 ppm spectral width, 5s relaxation delay. D_2O was used as solvent for the sample contained in a tube of 5 mm i.d. at 50 °C. Chemical shifts were expressed in ppm (δ) referenced to TSSP. Different controls were prepared: pectin-laccase, pectin-FA and native pectin.

II.5.4 LC-MS analyses

MS analyses were performed with a DionexUltiMate 3000-LTQ UHPLC-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary solvent delivery pump

connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ mass spectrometer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in electrospray positive ion mode (ESI⁺). Samples (10 µL) were separated on a AlltechAlltima C18 column (150 x 2.1 mm; 5µm), at 25 °C, with a flow rate of 0.2 mL/min. Compounds were eluted with a phase B made of acetonitrile (0.1 % acetic acid, v/v) and a phase A made of water (0.1 % acetic acid, v/v). A gradient (5-95 % phase B) was applied over 20 min. The products were analyzed in both the full-scan MS mode and the data-dependent MS/MS mode for structural investigation. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at 4.5 kV; source gases were set (in arbitrary units min⁻¹) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 40, 10, 10, respectively; capillary temperature was set at 300 °C; capillary voltage was set at 36 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 80 V, - 44 V, - 3.25 V, respectively. Ion optic parameters were optimized in ESI⁺ mode by automatic tuning using a standard solution of isopimpinelline at 0.1 g/L infused in the mobile phase (A/B: 50/50 v/v) at a flow rate of 5 µL/min [28]. Raw data were processed using the XCALIBUR software program (version 2.1).

III. Results and discussion

III.1 Functionalization of pectin with ferulic acid oxidation products

Laccase-mediated oxidation of ferulic acid (FA), starts by the abstraction of one hydrogen atom and then leads to reactive semiquinonic species. In the presence of pectin, these intermediates are expected to react with the functional groups of the polymer, leading to the grafting of phenolic entities. Oxidation reactions of ferulic acid catalyzed by the laccase were carried out with or without pectin aiming to assess the impact of the presence of the polymer on the reaction. At the macroscopic scale, the color of the reaction media of the solutions I and II, turned from colorless to orange. After 24 h of incubation, the color of the reaction mixture became dark brown due to

polymerization reactions. These observations are fully consistent with previous studies [23,29]. It must however be noted that a brighter color was observed in the medium containing pectin, comparing to that without pectin. Unsurprisingly, the reaction medium containing pectin exhibited a high viscosity comparing to the medium without pectin (FA-Laccase). The viscosity was observed to decrease throughout the synthesis. In further experiments, reactions were stopped after the complete conversion of FA.

The consumption of FA in the reaction mixtures was monitored. The oxidation kinetic of ferulic acid in the presence of pectin was significantly different, and more specifically slower than that obtained without pectin (Figure 1). Initial rates recorded within the first 7 minutes were $0.076 \mu\text{mol}/\text{min}$ in the presence of pectin and $0.13 \mu\text{mol}/\text{min}$ without pectin. These results could be explained by the viscosity of the reaction medium containing pectin, that limited the transfer of FA to the enzyme. Moreover, the total conversion of FA was reached after 240 min in the reaction media of both solutions I and II. Then, the reactions were stopped.

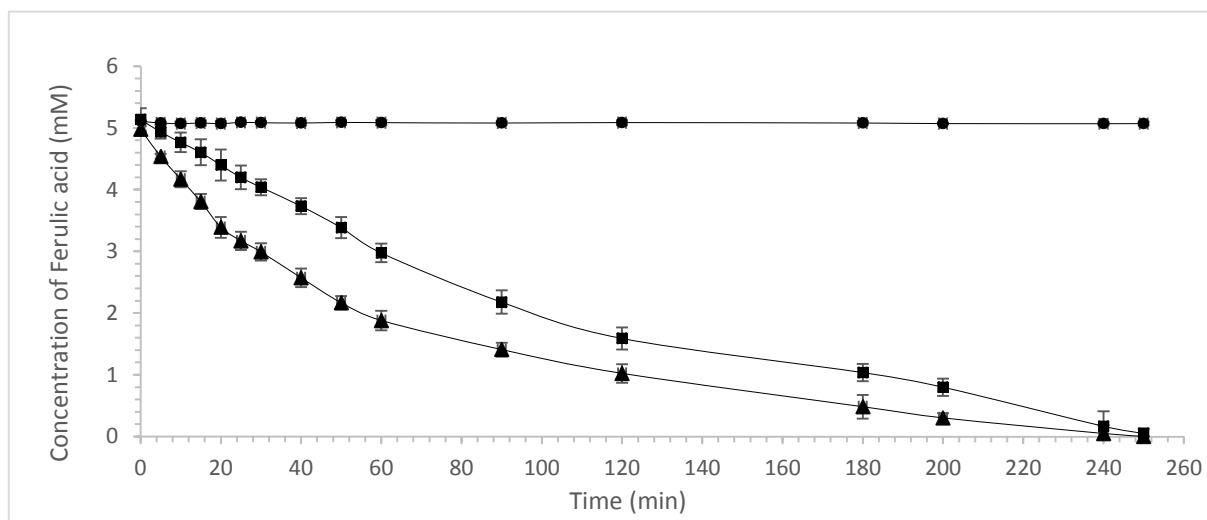


Figure 1: Kinetics of FA oxidation in different reaction media: FA with laccase (▲), FA with laccase and pectin (■), FA with pectin (●). All reactions were performed in phosphate buffer (pH 7.5), at 30 °C.

Additionally, FA concentration remained perfectly stable in a control medium that contained no laccase, showing that no reaction occurred in the absence of enzyme. This experiment also suggested that FA consumption was only due to laccase-mediated oxidation. Physicochemical interactions between various phenolic acids such as ferulic acid, caffeic acid and chlorogenic acid and cellulose-pectin composites have already been observed by other authors after long exposure time (12 days) [30]. In this study, the assumption that FA is at least partly adsorbed onto pectin chains, could be ruled out.

Previous studies showed that laccase activity could be drastically reduced as FA oxidation products were formed in the reaction medium [31]. Some authors showed that this phenomenon could be limited by the addition of chitosan (Aljawish et al., 2012). In the present study, the capacity of pectin to limit laccase inhibition was assessed through fed batch reactions. Laccase-mediated oxidation of FA was performed in the presence of pectin. After the total conversion of FA, reactors were fed with a further addition of FA (5 ml, 50 mM). The conversion of the newly added FA was monitored (Figure 2). Results showed that the laccase remained active when pectin was in the reaction medium. The initial rate of the second step of the reaction was 0.058 $\mu\text{mol}/\text{min}$ against 0.076 $\mu\text{mol}/\text{min}$ for the first step, indicating a partial loss of enzymatic activity. These results suggested that pectin could rapidly capture FA oxidation products thus limiting laccase inhibition.

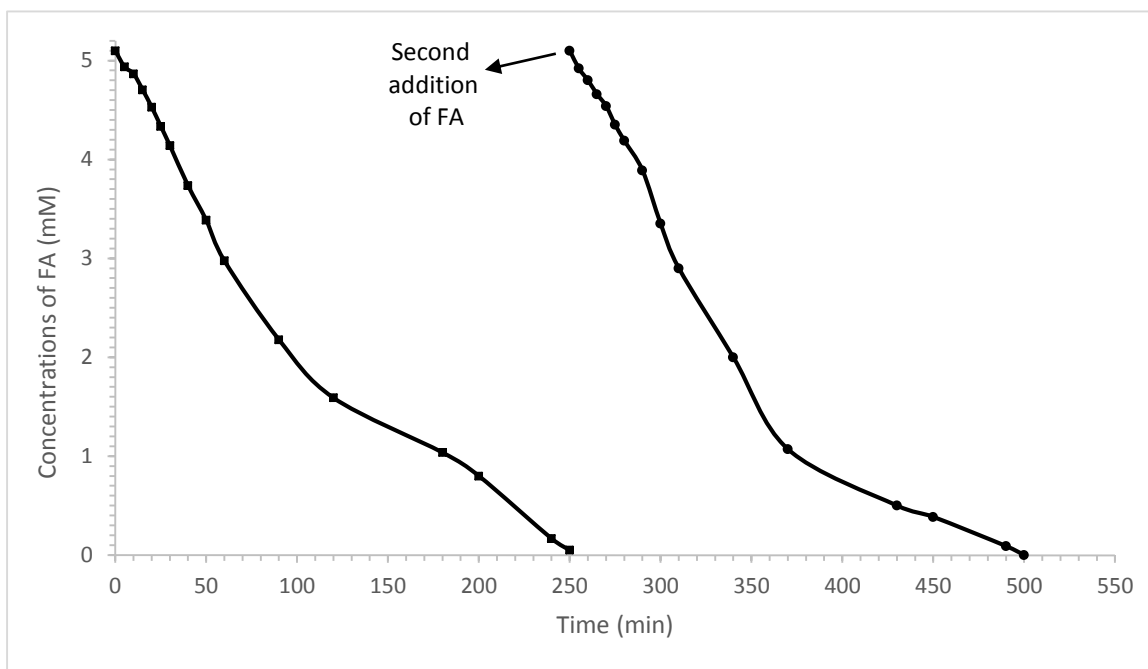


Figure 2: Kinetics of FA oxidation catalyzed by the laccase in fed-batch mode: consumption of FA initially present in the reaction medium (■), consumption of newly added FA (●). Reactions were performed in the presence of pectin, in phosphate buffer (pH 7.5), at 30 °C.

III.2 Characterization of native and modified pectin

Pectin powders issued from oxidation reactions were characterized according to their content in phenolic compounds and their structural properties. Data were systematically compared to those obtained with native pectin.

III.2.1 Total phenolic content

During the reaction, pectin functional groups were expected to react with FA oxidation products, leading to their grafting onto the polysaccharide chains. The extent of this grafting was determined through total phenol measurement. Analyses showed that the modified pectin contained

five times more phenols than the native pectin (54.7 +/- 0.3 mg Gal Eq/g DW against 9.9 +/- 0.8 mg Gal Eq/g DW, respectively). In view of these results, functionalization of pectin with FA oxidation products appears as an interesting way to produce phenol-enriched polysaccharides. Such polymers are expected to exhibit combined properties and appears as promising polyfunctional compounds. Similar results were observed in a previous study about the functionalization of chitosan with FA oxidation products [29]. A phenolic content of 24.50 ± 1.00 mg Gal Eq/g DW was found in the modified chitosan compared to none in native chitosan.

Unsurprisingly, native pectin contained phenols in its structure (9.9 +/- 0.8 mg Gal Eq/g DW). These phenols corresponded to ferulic acid entities bounded to side-chain neutral sugars of pectin [33]. Other authors showed that citrus pectin had a feruloylation degree of 0.12 - 0.34 % [32]. In the presence of laccases or peroxidases, these phenolic entities were involved in oxidative crosslinking pathways [19,34,35]. In view of these information, two mechanisms are expected to occur during the functionalization of pectin by laccase-mediated oxidation of ferulic acid. The first one consisted in the oxidation of the exogenous FA followed by the grafting of its oxidation products onto the pectin chains; the second one could be the oxidation of endogenous FA units, leading to the crosslinking of polysaccharidic chains.

III.2.2 Electrophoretic mobility

A successful grafting of FA-oxidation products onto pectin was expected to change the surface charge of pectin chains, regardless of the charge distribution. Thus, electrophoretic mobility measurements of aqueous solutions containing native pectin or modified pectin were performed (Table 1).

Table 1: Electrophoretic mobility of native and modified pectin. Samples (10 mg/ mL) were prepared in water, at 25 °C and pH 4.5

Type of pectin	Electrophoretic mobility ($\mu\text{m.cm/V.s}$)
Native pectin	-2.00 +/- 0.15
Modified pectin	-1.49 +/- 0.18

Due to the linear relationship between the electrophoretic mobility and the chain-averaged charge density [36,37], results showed that the modified pectin was less charged than the native pectin suggesting a decrease of carboxylate groups availability. In other studies, the charge distribution over the pectin chains and thus its electrophoretic mobility were found to depend on its esterification degree (DE), the highest DE leading to the lowest mobility [38–40]. A similar trend was observed in the present study later on, suggesting that the carboxyl groups of pectin might be involved in the grafting of phenolic compounds on this last during the reaction.

III.3 Spectral characterization

Various spectral analyses were achieved aiming to provide a chemical evidence of the modifications brought to pectin structure during the reaction.

III.3.1 Absorption in UV-visible domain

UV-visible analyses were performed in order to highlight the grafting of phenolic compounds onto pectin chains and to give factual data supporting experimental observations (especially color change). Whatever the type of pectin, a high absorbance around 200 nm, was observed (Figure 3). Although this spectral region is unspecific, absorbance could be attributed, according to other studies, to galacturonic acid carboxyl groups [41]. The absorbance around 270-280 nm was also partly due to galacturonic acid units [41,42]. Moreover, this range of radiations is absorbed by aromatic compounds and has been previously related to ester-linked FA in citrus pectin [32]. In this spectral region, the higher absorbance of modified pectin compared to the native one, gave

evidence of the grafting of phenolic compounds onto the polysaccharide chains. This was reinforced by the high absorbance of the modified pectin around 325 nm (wavelength of maximum absorption for FA).

Additionally, a weak absorbance of the modified pectin in the visible-region ($\lambda > 400$ nm) was observed (data not shown) while native pectin did not show any absorbance. This was responsible for the orange color of the modified pectin compared to the white-cream color of the native pectin.

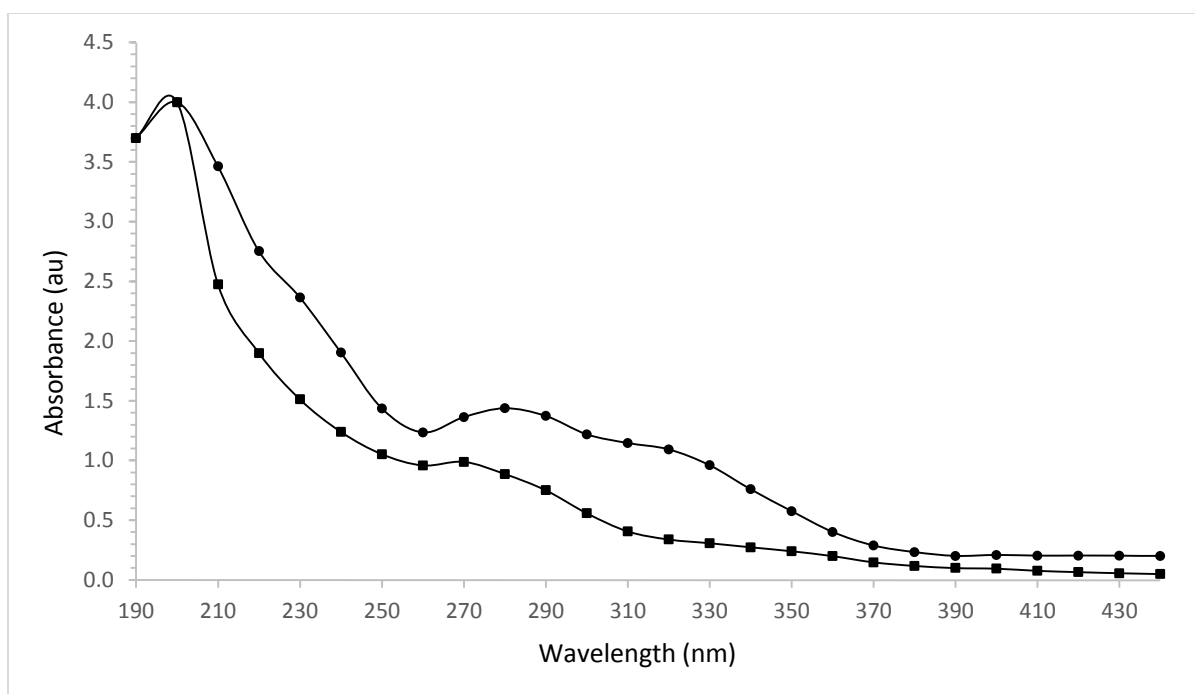


Figure 3: Absorption of aqueous solutions (1 g/l, w/v) of native pectin (■) and modified pectin (●) in the UV-visible domain

III.3.2 Absorption in IR domain

Contrarily to UV-visible spectroscopy, IR spectroscopy was expected to provide detailed information about the chemical functions that constitute the analyte. FT-IR analyses were performed aiming to highlight the structural differences between the native and the modified pectins. As shown in Figure 4, the characteristic absorption bands of native pectin were also found in the spectrum of the modified pectin, showing that the basic structure of the polymer was maintained. However, small differences were observed especially in the spectral region below 1800 cm^{-1} . The bands at 1750 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} correspond to carbonyl bond stretching in esterified and nonesterified carboxyl groups, respectively. These two bands can be used to determine the degree of esterification (DE) of pectin [27,43]. The native pectin exhibited a degree of esterification of 17 +/- 3 % corresponding to a low-methoxyl pectin (LM). In the case of the pectin functionalized with FA oxidation products, the DE was 22 +/- 2 %. Specifically, the peak area of the esterified carboxyl groups (1750 cm^{-1}) remained the same in both pectins, however, that of the free carboxyl groups (1650 cm^{-1}) was lower for the modified pectin, than for the native polysaccharide.

According to other authors, the fingerprint region (1300-800 cm^{-1}) can reflect variations in the composition of pectin monosaccharide composition [44,45] and corresponds mainly to coupled C-C, C-O-C and C-OH vibration modes of carbohydrate rings and glycosidic linkage. Two additional peaks were observed in modified pectin compared to native pectin. The first one at 1000 cm^{-1} was attributed to C-OH bonds and the second one at 852 cm^{-1} is usually attributed to para substituted aromatic rings of FA-oxidation products.

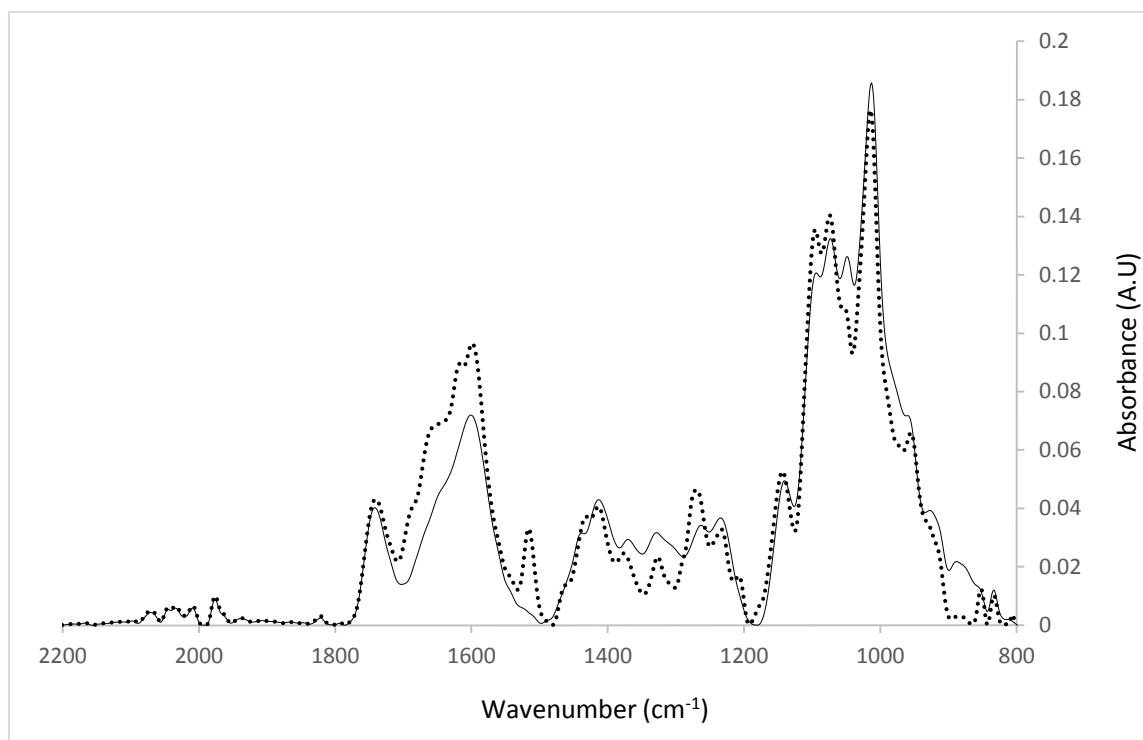


Figure 4: FT-IR spectra of native (dotted line) and pectin (solid line) modified with FA oxidation products

In view of these results, the functionalization of pectin with laccase-mediated FA oxidation products did not appear to modify the basic structure of the polysaccharide. The higher DE of the modified pectin compared to that of the native pectin suggested the involvement of carboxylate groups in the grafting of phenolic compounds. The presence of phenolic entities in the structure of the modified pectin was demonstrated.

III.3.3 NMR analyses

NMR was used in order to characterize the changes brought to the structure of pectin chains due to the grafting of phenols. Experiments were performed on three samples: the native pectin as a reference, the pectin grafted with phenols, and a mix of native pectin and FA oxidation products. This latter sample was prepared aiming to discriminate structural changes coming from the grafting of phenols onto the pectin from those relative only to the presence of FA oxidation products.

Assignment of the hydrogens and carbons of galacturonic acid units obtained with the native pectin was given in Table 2 [46–48].

Table 2: ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts (ppm) of galacturonate units in native pectin (D_2O solvent, pH 7)

Atoms n°	1	2	3	4	5	6	OCH_3
^1H	5.0 (free) 4.9 (ester)	3.8 (free) 3.6(ester)	3.8 (free) 3.6(ester)	4.4	4.6 (free) 5.0 (ester)	-	- 3,8 (ester)
^{13}C	99.7 (free) 100,5 (ester)	68.0- 69.0	68.0- 69.0	78.8- 79.2	72.0 (free) 71.1 (ester)	171,4 (free) 175,4 (ester)	- 53,4 (ester)

Carbon-13 spectra of the three samples were very similar, and did not reveal any significant change from one sample to the other, indicating that the main structure of the pectin was maintained. Proton spectra were more informative: some differences appeared and could be a clue of the structural modifications brought to the pectin grafted with FA oxidation products. The main differences could be summarized as following:

- i) The H-5 area of the ^1H NMR spectra (4.6-5.0ppm) was modified when going from the native pectin to the modified pectin, suggesting a chemical modification of the C-6 carbons of the galacturonate units. This observation could be linked to the decrease of intensity relative to the carboxyl groups observed in IR spectra.
- ii) The signals observed in the aromatic region of ^1H spectra (6.0-8.0ppm) corresponded mainly to FA oxidation products and to ferulic acid units that were naturally present in the native pectin. A large signal appeared in this area in the case of the modified pectin that could be an indication of the grafting of phenolic entities. A similar signal was also present in the third sample due to the presence of FA oxidation products.

Due to the weak degree of functionalization and the low sensitivity of these NMR measurements, no further meaningful differences between the three samples could be attested.

These observations led to conclude that the structure of pectin was modified during the laccase-mediated oxidation process, but the deep structural changes accompanying this reaction could not be completely revealed because of the low sensitivity of the NMR technique. 2D HSQC experiments were also performed but did not provide more detailed information.

III.4 Functionalization of pectin monomer with ferulic acid oxidation products

Given the difficulties encountered in the structural characterization of the whole polymer, the functionalization of a simplified model system was considered. Galacturonic acid was chosen as the most representative monomer unit of pectin. Its functionalization was expected to provide information about the possible mechanism of grafting of FA oxidation products onto pectin. To this end, the laccase-mediated oxidation of FA was performed in the presence of galacturonic acid. Three controls were also prepared, one without laccase, one without FA and another one without galacturonic acid.

LC-MS analysis of the reaction medium in positive mode revealed the presence of a new peak ($m/z = 630$, $M+H$, retention time 14.18 min) that was not found in the controls. The MS_2 fragmentation of this ion gave several secondary ions, one of them having a m/z of 341 ($M+H$) (Figure 5). According to previous results, this corresponded to a decarboxylated and dehydrogenated form of FA-dimer [29]. The further fragmentation of this ion (m/z of 341 $M+H$) gave the same fragmentation pattern as FA-oxidation product of mass 340, found in the control.

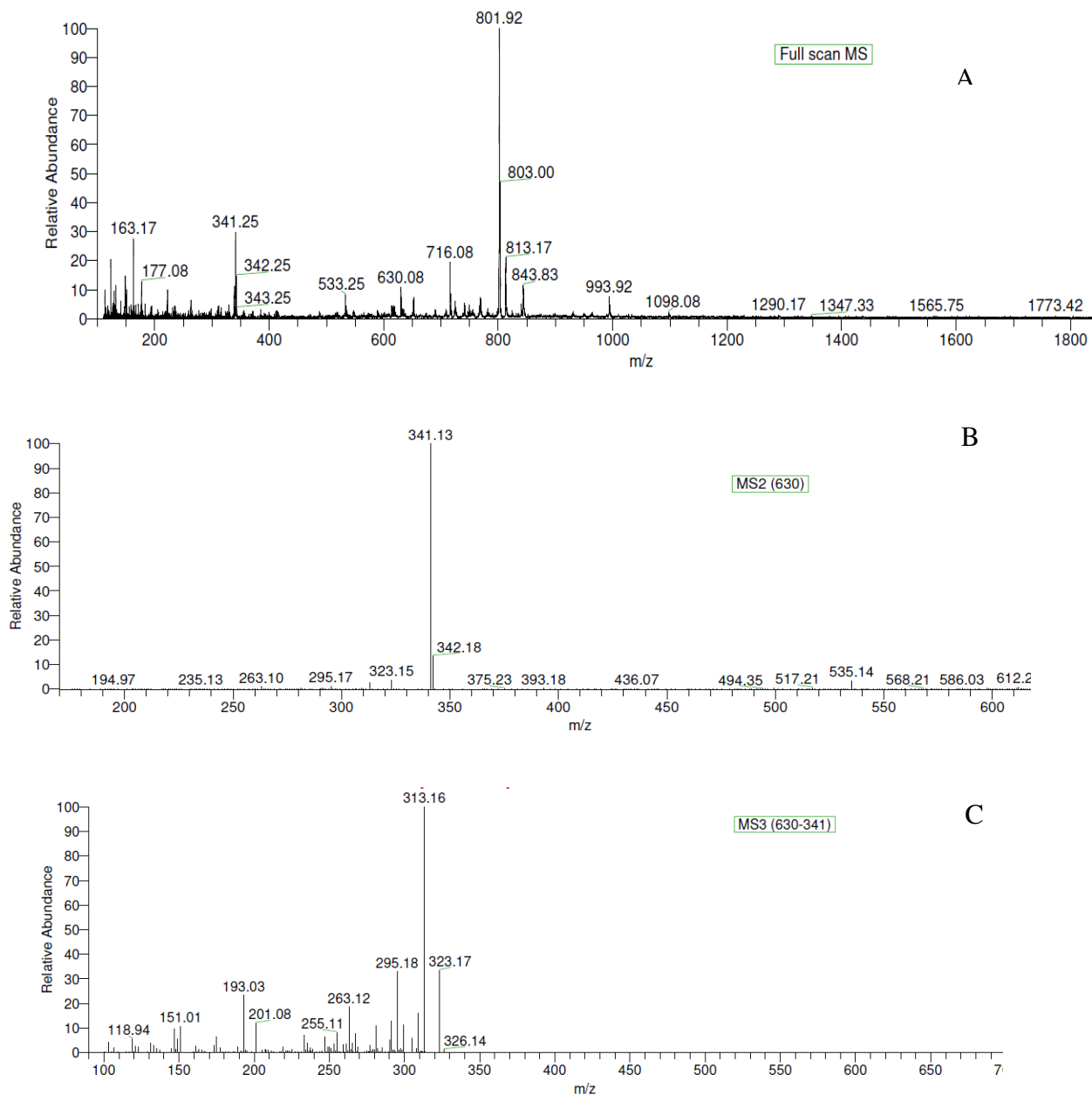


Figure 5: LC-MS spectra (positive mode) of the reaction medium constituted of galacturonic acid, FA and laccase: (A) full scan MS spectrum of the newly formed product, (B) MS₂ fragmentation spectrum of ion m/z= 630, (C) MS₃ fragmentation spectrum of ion m/z=630

These results suggested that the functionalization of galacturonic acid with FA-oxidation products led to a new product having a mass of 629 g/mol. This product contained at least two units of FA, probably linked to galacturonic acid through an ester bond. In order to verify this assumption, another reaction was performed with galactose instead of galacturonic acid. In that case, LC-MS spectrum showed the formation of FA oxidation products just as in the control medium, suggesting that no grafting occurred on galactose unit having no carboxyl group.

IV. Conclusion

The modification of citrus pectin with FA oxidation products catalyzed by the laccase of *Myceliophthora thermophyla* was investigated. The total conversion of FA was obtained after few hours of incubation, leading to colored pectin powders. Results gave evidence of the phenolic entities grafting onto the polysaccharide chains. Spectral data suggested that the carboxylate groups of galacturonic acid units could be linked to decarboxylated FA dimers through ester bonds. Nevertheless, due to the complex structure of pectin and considering the complexity of laccase-mediated oxidation reactions, the possibility of other binding modes could not be excluded. In particular, the crosslinking of pectin due to the oxidation of endogeneous FA units might be considered. This ecofriendly process appeared as a promising way to provide new polysaccharides with improved functionalities using renewable resources.

V. References

- [1] P. Srivastata, R. Malviya, Source of pectin, extraction, and its applications in pharmaceutical industry- an overview, (2011) 10–18.
- [2] W. Zhang, K.M. Mahuta, B.A. Mikulski, J.N. Harvestine, J.Z. Crouse, J.C. Lee, et al., Novel pectin-based carriers for colonic drug delivery, *Pharm. Dev. Technol.* (2014) 1–4.
- [3] A. O’neil, B. Schumacher, Application of a pectin barrier for medical adhesive skin injury (epidermal stripping) in a premature infant, *J. Wound Ostomy Cont. Nurs. Off. Publ. Wound Ostomy Cont. Nurses Soc. WOCN.* 41 (2014) 219–221.

- [4] D. Saha, S. Bhattacharya, Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, *J. Food Sci. Technol.* 47 (2010) 587–597.
- [5] S.-H. Yoo, M.L. Fishman, A.T. Hotchkiss, H.G. Lee, Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 62–67.
- [6] W.G.T. Willats, J.P. Knox, J.D. Mikkelsen, Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 97–104.
- [7] Y.S. Ovodov, Current views on pectin substances, *Russ. J. Bioorganic Chem.* 35 (2009) 269–284.
- [8] Z.I. Kertesz, The pectic substances, *J. Am. Pharm. Assoc.* (1952) 308 pages.
- [9] L.K. Ulrike Schmidt, Effect of Molecular Weight Reduction, Acetylation and Esterification on the Emulsification Properties of Citrus Pectin, *Food Biophys.* 10 (2014).
- [10] L. Liu, M.L. Fishman, K.B. Hicks, Pectin in controlled drug delivery – a review, *Cellulose.* 14 (2007) 15–24.
- [11] O. Kurita, Y. Miyake, E. Yamazaki, Chemical modification of citrus pectin to improve its dissolution into water, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1720–1727.
- [12] M.S. Bhatia, Chemical Modification of Pectins, Characterization and Evaluation for Drug Delivery, *Sci. Pharm.* 76 (2008) 775–784.
- [13] A.G. Cunha, A. Gandini, Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates, *Cellulose.* 17 (2010) 1045–1065.
- [14] G.M. Gübitz, A.C. Paulo, New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 577–582.
- [15] J. Harholt, A. Suttangkakul, H.V. Scheller, Biosynthesis of Pectin, *Plant Physiol.* 153 (2010) 384–395.
- [16] Z.D.N. Abang, S. Meyer Anne, Oxidative enzymatic gelation of sugar beet pectin for emulsion stabilization, *Res. J. Biotechnol.* Vol. 8 (2013) 7.
- [17] J. Jung, L. Wicker, Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability, *Food Hydrocoll.* 28 (2012) 168–173.
- [18] D.N.A. Zaidel, A. Arnous, J. Holck, A.S. Meyer, Kinetics of Enzyme-Catalyzed Cross-Linking of Feruloylated Arabinan from Sugar Beet, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 11598–11607.
- [19] D.N.A. Zaidel, I.S. Chronakis, A.S. Meyer, Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology, *Food Hydrocoll.* 28 (2012) 130–140.
- [20] A.M. Mayer, R.C. Staples, Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry.* 60 (2002) 551–565.

- [21] A. Aljawish, I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, et al., Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 537–544.
- [22] K. Lacki, Z. Duvnjak, Modeling the enzymatic transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenoloxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Biotechnol. Bioeng.* 51 (1996) 249–259.
- [23] R. Mustafa, L. Muniglia, B. Rovel, M. Girardin, Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system, *Food Res. Int.* 38 (2005) 995–1000.
- [24] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: Lester Packer (Ed.), *Methods Enzymol.*, Academic Press, 1999: pp. 152–178.
- [25] M. Skowrya, V. Falguera, G. Gallego, S. Peiró, M.P. Almajano, Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions: Antioxidant properties of extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods, *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 911–918.
- [26] S. Levigne, M. Thomas, M.-C. Ralet, B. Quemener, J.-F. Thibault, Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards, *Food Hydrocoll.* 16 (2002) 547–550.
- [27] A.K. Chatjigakis, C. Pappas, N.Proxenia, O.Kalantzi, P.Rodis, M. Polissiou, FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes, *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 395–408.
- [28] F. Karamat, A. Olry, R. Munakata, T. Koeduka, A. Sugiyama, C. Paris, et al., A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley, *Plant J.* 77 (2014) 627–638.
- [29] A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, C. Paris, J. Scher, L. Muniglia, Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: a green procedure for the synthesis of new compounds, *Food Chem.* 145 (2014) 1046–1054.
- [30] A. Padayachee, G. Netzel, M. Netzel, L. Day, D. Zabarar, D. Mikkelsen, et al., Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 2: Phenolic acids, *Food Chem.* 135 (2012) 2287–2292.
- [31] S. Ou, K.-C. Kwok, Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 1261–1269.
- [32] Y. Georgiev, M. Ognyanov, I. Yanakieva, V. Kussovski, M. Kratchanova, Isolation, characterization and modification of citrus pectins, *J. Biosci. Biotechnol.* (2012) 223–233.
- [33] P. Jankovska, J. Copikova, A. Sinitsya, The determination of ferulic acid in sugar beet pulp, *Czech J. Food Sci.* 19 (2001) 143–147.

- [34] F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, Enzyme Initiated Radical Polymerizations, *Polymers*. 4 (2012) 759–793.
- [35] B. Zeeb, L. Fischer, J. Weiss, Cross-linking of interfacial layers affects the salt and temperature stability of multilayered emulsions consisting of fish gelatin and sugar beet pectin, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 10546–10555.
- [36] N. Volpi, *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates: From Monosaccharides to Complex Polysaccharides*, Springer Science & Business Media, 2010.
- [37] M.A.K. Williams, T.J. Foster, H.A. Schols, Elucidation of Pectin Methylester Distributions by Capillary Electrophoresis, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1777–1781.
- [38] R. Lutz, A. Aserin, L. Wicker, N. Garti, Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 786–794.
- [39] E.D. Ngouémazong, S. Christiaens, A. Shpigelman, A. Van Loey, M. Hendrickx, The Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Pectin: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14 (2015) 705–718.
- [40] A. Paulus, A. Klockow-Beck, *Analysis of Carbohydrates by Capillary Electrophoresis*, Springer Science & Business Media, Kevin Altria, 2013.
- [41] G.A. Morris, Z. Hromádková, A. Ebringerová, A. Malovíková, J. Alföldi, S.E. Harding, Modification of pectin with UV-absorbing substituents and its effect on the structural and hydrodynamic properties of the water-soluble derivatives, *Carbohydr. Polym.* 48 (2002) 351–359.
- [42] Y. Xia, J. Liang, B. Yang, Q. Wang, H. Kuang, A new method for quantitative determination of two uronic acids by CZE with direct UV detection, *Biomed. Chromatogr. BMC.* 25 (2011) 1030–1037.
- [43] R. Gnanasambandam, A. Proctor, Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Chem.* 68 (2000) 327–332.
- [44] A.A. Kamnev, M. Colina, J. Rodriguez, N.M. Ptitchkina, V.V. Ignatov, Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources, *Food Hydrocoll.* 12 (1998) 263–271.
- [45] M.A. Monsoor, U. Kalapathy, A. Proctor, Improved Method for Determination of Pectin Degree of Esterification by Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2756–2760.
- [46] H.N. Cheng, T.G. Neiss, Solution NMR Spectroscopy of Food Polysaccharides, *Polym. Rev.* 52 (2012) 81–114.
- [47] M.-A. Ha, R.J. Viëtor, G.D. Jardine, D.C. Apperley, M.C. Jarvis, Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin, *Phytochemistry*. 66 (2005) 1817–1824.

- [48] C.M.G.C. Renard, M.-J. Crépeau, J.-F. Thibault, Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins, *Carbohydr. Res.* 275 (1995) 155–165.

I.3 Contribution de l'article

Cette étude présente une méthode enzymatique de fonctionnalisation de la pectine de citron avec les produits d'oxydation de l'acide férulique, catalysée par une laccase.

A l'échelle macroscopique, des changements de couleur du milieu sont observés au cours de la réaction. Une pectine sous forme de poudre de couleur orangée est obtenue.

Un suivi cinétique a permis de montrer que l'acide férulique est totalement converti après 4 heures de réaction. La présence de pectine dans le milieu semble ralentir la cinétique d'oxydation de l'acide férulique ; elle limite par ailleurs l'inhibition de la laccase par les produits d'oxydation générés (Ou & Kwok, 2004). Ceci avait déjà été observé dans une étude antérieure portant sur la fonctionnalisation du chitosane par un procédé similaire (Aljawish et al., 2014).

Des analyses biochimiques ont permis de démontrer l'incorporation de composés phénoliques dans la structure de la pectine. Ainsi, la pectine modifiée contient 5 fois plus de phénols que la pectine native.

Des analyses structurales plus poussées ont été menées pour essayer d'identifier les types de liaisons établies entre le polysaccharide et les produits d'oxydation de l'acide férulique. Ainsi, l'implication des groupements carboxyles, des unités d'acide galacturonique constituant la pectine, dans le greffage de composés phénoliques a été mise en évidence. Ceci a pu être confirmé en étudiant la fonctionnalisation d'un système simplifié modèle constitué d'acide galacturonique. Plus précisément, l'établissement d'une liaison ester entre les fonctions carboxyles de l'acide galacturonique et les produits d'oxydation de l'acide férulique a été démontré.

En conclusion, cette étude a permis de montrer la faisabilité du greffage de composés phénoliques sur la pectine en présence d'une laccase. Des éléments sur le type de liaisons établies ont été apportés. Toutefois, au vu de la complexité structurale de la pectine et de la complexité des

réactions radicalaires initiées par les laccases, de nombreux modes de liaison peuvent être envisagés rendant difficile l'identification des produits générés. Le procédé proposé apparaît comme une voie efficace et respectueuse de l'environnement pour l'obtention de nouveaux polysaccharides à partir de ressources renouvelables. L'étude des propriétés des dérivés de pectine produits permettra de préciser le potentiel applicatif de ces polymères.

II. Chapitre II : Influence du greffage de composés phénoliques sur les propriétés de la pectine : caractérisation d'un nouvel ingrédient fonctionnel

II.1 Introduction

La pectine est un polymère biodégradable qui possède des propriétés intéressantes lui permettant d'être utilisée dans divers domaines industriels (Mishra, Banthia, & Majeed, 2012). De nombreuses études ont été menées sur la modification enzymatique de la pectine pour améliorer ses fonctionnalités afin d'élargir ses champs d'applications (Zaidel, Chronakis, & Meyer, 2012). Ces modifications sont généralement réalisées à l'aide de biocatalyseurs appartenant à la famille des oxydoréductases tels que les tyrosinases, les peroxydases et les laccases (Jung & Wicker, 2014; Kuuva, Lantto, Reinikainen, Buchert, & Autio, 2003; Zaidel et al., 2012).

L'étude présentée ci-dessous est la continuité du chapitre portant sur le greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine. La faisabilité de cette approche a été démontrée dans le premier article en s'appuyant sur des méthodes biochimiques, physicochimiques et structurales. L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de cette fonctionnalisation de la pectine sur ses propriétés physico-chimiques. Plusieurs articles rapportent l'utilisation de la modification enzymatique de la pectine de betterave naturellement féruloylée afin d'améliorer sa solubilité (Jiyoung Jung, 2012), sa stabilité en émulsion (Jung & Wicker, 2012) ou ses propriétés rhéologiques (Kuuva et al., 2003). Cependant, d'après la littérature, aucune étude n'a été menée sur les propriétés résultant du greffage exogène de composés phénoliques sur la pectine par une méthode enzymatique.

Les principales questions scientifiques relatives à cette étude sont les suivantes : la fonctionnalisation enzymatique de la pectine a-t-elle un impact sur ses propriétés techno-

fonctionnelles ? Le greffage exogène de composés phénoliques confère-t-il des propriétés antioxydantes au polymère ?

Pour répondre à ces questions, l'article suivant se focalise sur l'analyse des propriétés de la pectine fonctionnalisée : couleur, morphologie de la surface, comportement thermique et hygroscopique, viscosité en solution aqueuse, gélification en présence de calcium et activité antioxydante. Les résultats obtenus avec la pectine fonctionnalisée ont été comparés avec ceux obtenus avec le polymère natif aux mêmes échelles : moléculaire, microscopique et macroscopique. Une recherche de corrélation entre la structure du polymère et ses propriétés a été menée.

II.2 Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols

Nadine Karaki¹, Abdulhadi Aljawish¹, Catherine Humeau², Lionel Muniglia¹, and Jordane Jasniewski*

¹* Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

*Corresponding author: jordan.jasniewski@univ-lorraine.fr

Article soumis dans “Food hydrocolloids”

Abstract

Pectin is a natural polysaccharide with interesting properties that allow it to be used in many industrial fields. The aim of this work was to study the impact of pectin modification on the properties of this latter. Results suggested that the enzymatic grafting of ferulic acid (FA) oxidation products onto the pectin altered its morphological surface and its thermal properties. Moreover, modified pectin showed a less hygroscopic behavior when water activity is less than 0.50 and a higher ability to bound water above 0.5. Additionally, modified pectin became less viscous than the native pectin and presented different calcium-dependent gelation behaviour. Finally, a significant improvement of the antioxidant properties of pectin after functionalization was observed. As a conclusion, the modification of pectin with phenolic compounds appeared as a promising way to produce a polysaccharide with new properties that could enlarge the field of its potential applications.

Keywords: pectin, ferulic acid, functionalization, antioxidant, rheology, hygroscoy

Highlights:

- The physicochemical properties of pectin grafted with phenols were studied
- The morphological surface and the thermal properties of the pectin were altered
- Pectin grafted with phenols showed a slower gelation rate
- Grafting of phenols enhanced the antioxidant activity of pectin

1. Introduction

Pectin is an anionic high-molecular weight polysaccharide commercially extracted from the cell wall of citrus peel, apple pomace and sugar beet (Qiu, Tian, Qiao, & Deng, 2009). It is composed of a linearly α -1,4-linked D-galacturonic acid residues backbone interrupted occasionally by (1,2)-linked rhamnose residues (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). Pectin is well known for its gelling and thickening properties that justify its extensive use as a food ingredient. Many studies reported the existence of a correlation between the chemical structure of pectin and its techno-functional properties (Chen et al., 2015; Sila et al., 2009). The esterification and acetylation degrees of pectin appear as crucial structural characteristics that are mostly exploited to produce biopolymers with modulated properties (Buchholt, Christensen, Fallesen, Ralet, & Thibault, 2004; Cheng & Gu, 2012; van den Broek & Boeriu, 2013). Such modifications were performed aiming to overcome the major drawbacks of pectin (formation of lumps, swelling behavior, hydrophilic nature) when used in some specific areas (Kurita, Miyake, & Yamazaki, 2012). Another approach was described using a laccase-catalyzed oxidation reaction of feruloylated sugar beet pectin. In this reaction, endogenous ferulic acid units were oxidized leading to reactive semiquinones that can subsequently form ferulic acid dimers allowing pectin crosslinking. The crosslinked structures have showed improved rheological properties (Kuuva, Lantto, Reinikainen, Buchert, & Autio, 2003; Zaidel, Chronakis, & Meyer, 2012), useful for the preparation of *in situ* hydrogels (Takei, Sugihara, Ijima, & Kawakami, 2011) or for the formation of stable emulsions (Zaidel & Meyer, 2013). This approach was also applied to conjugate sugar beet pectin with proteins. In this case, the protein solubility in water was enhanced at its isoelectric point, avoiding its precipitation (Jung & Wicker, 2012). As reported by several studies, laccases could also be used to enrich polysaccharides with phenols. In this instance, semiquinones generated from laccase-catalyzed oxidation of exogenous phenols reacted with nucleophilic functions present in the reaction

medium leading to their grafting onto the polysaccharide chains (Elegir, Kindl, Sadocco, & Orlandi, 2008; Y. Liu et al., 2014; Torres et al., 2012).

The main scientific issue related to this work was to compare the physical-chemical properties of native pectin with those of pectin modified with exogenous phenolic species issued from laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid. The color, the thermal and hygroscopic behavior, the morphological state, the rheological properties and the antioxidant capacity were more specifically studied for a qualitative and/or quantitative examination of the polysaccharide.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and enzyme

Citrus pectin with galacturonic acid $\geq 74.0\%$ (dried basis) and with a methoxylation degree $\geq 6.7\%$, ferulic acid (FA), and 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS) were purchased from Sigma–Aldrich (France). The following chemicals 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), methanol, ethanol and acetone were obtained from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA).

An industrial laccase named Suberase[®] (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) was bought from the Society Novozymes under liquid form. The Suberase[®] is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila* sp., which is considered as a member of family of polyphenol oxidases, produced by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus oryzae*. The enzymatic preparation was supplied as a brown liquid with a density of approximately 1.15 g.mL⁻¹. It was completely miscible with water. Laccase activity is 13.5 UI/mL.

The pectin was functionalized with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid according to the method described by Aljawish et al. (2012). Briefly, the modification reaction was performed at 30 °C by the addition of 5 ml of methanol solution of ferulic acid 50 mM, 1 g of low methoxyl pectin and 45 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) in the reactor. The addition of 13.5 UI/mL of Suberase[®] (a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila*)

trigger the reaction, which was carried out for four hours. The reaction medium was then kept in a freezer for 24 h, then freeze-dried for 72 h. Next, the powder was washed with organic solvents (methanol, ethanol and acetone) to remove unbounded phenols that could be adsorbed onto pectin through electrostatic interactions. Finally, the powder was kept in a desiccator until use.

2.2 Physicochemical properties

2.2.1 Thermal Stability Analysis

Before analysis, all samples were dried at room temperature in a desiccator, containing P_2O_5 as drying agent, for at least one week. The differential scanning calorimetry measurement was carried out using a DSC (DSC 204 F1 Phoenix, Netzsch, Germany) under dynamic inert nitrogen atmosphere, with a flow rate of 4 ml/min. Approximately 10 mg of pectin powders were weighted in an aluminum capsule and placed in the DSC system in parallel to an empty capsule used as reference. The program was fixed to perform a first round of heating from 0 to 200 °C in a 5 K/min rate, followed by a cooling from 200 to 0 °C at the same rate 5 K/min. Then a second heating from 0 to 300 °C at 5 K/min was performed. All runs were performed at least in triplicate.

2.2.2 Surface analysis

The morphologies of native pectin and pectin grafted with phenols were observed using a Hitachi scanning electron microscopy (SEM) S4800. Before testing, the samples were evaporated with carbon and then coated with gold, to make the samples conductive. SEM was performed under high vacuum at an accelerating voltage of 10 kV. The microphotographs were taken using automatic image capture software.

2.2.3 Water sorption isotherms

The Dynamic Vapor Sorption was used to monitor the moisture sorption capacity of pectin powders as a function of water activity (a_w). Measuring the water sorption, provided

information about the physical and chemical stability of the sample under given storage conditions. Water sorption isotherms were determined gravimetrically using a DVS apparatus (Surface Measurement Systems, London, UK) equipped with a Cahn microbalance. The changes in sample weight over time at 25 °C and at any desired a_w (between 0 and 0.9) were recorded. About 70 to 80 mg of sample were loaded onto the quartz sample pan. The program was initially set to control the water activity at 0 for 12 h (drying phase). This step allowed the sample water activity to decrease to zero and internally equilibrate. The sample was then subjected to successive steps of 0.1 a_w increase, up to 0.9. For each step, the mass changes (m) and the rate of mass changes (dm/dt) were plotted against time. The equilibrium was considered to be reached when changes in mass with time were lower than 0.001% total weight/min (i.e. 1 g water/100 g dry basis/day). All experiments were performed at 25 °C and 3 tests were carried out for each sample. The accuracy of the system was $\pm 0.01 a_w$ and ± 0.2 °C, respectively.

The rate at which the material equilibrated at each humidity level, as well as the overall shape of the resulting adsorption profile, provided useful information about the structure material and long-term stability.

2.2.4 Rheological measurements

2.2.4.1 Viscosity measurements

The viscosity of solutions prepared in deionized water (pH 6.5) with several concentrations (from 1% to 4% w/v) of native and modified pectin were determined using a Kinexus rotative rheometer (Malvern Instruments, KNX 2100, UK) with a cone-plate geometry (50 mm of diameter, angle of 2°), at constant temperature (25 °C), just after the pectin solutions were prepared. The shear rate was increased from 0.001 to 100 s⁻¹. The Newtonian and power law models were used to analyze the rheological behavior of the samples. Each viscosity measurement was performed in triplicate. The temperature was controlled by a Peltier system and the sample was covered with paraffin oil to avoid evaporation.

2.2.4.2 Oscillation measurements

Oscillatory measurements were used to determine the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 2% pectin solutions using a 50 mm parallel plate at 25 °C. Strain sweep (0.01–100 % at 1 Hz) was applied to test the linear viscoelastic region of the samples. The frequency dependence of G' and G'' was determined by a frequency sweep (0.1–30 Hz at 1% strain) (Zhang et al., 2013).

2.2.4.3 Gelation rate determination

2ml of solutions with 12.5 g of native and modified pectin were prepared in 0.1 M NaCl, in order to screen electrostatic interactions. The pH was adjusted to 6.5 to obtain fully charged chains (Capel, Nicolai, Durand, Boulenger, & Langendorff, 2006). Then, a certain amount of CaCl_2 which corresponded to $R = (2 [\text{Ca}^{2+}] / ([\text{COO}^-]) = 0.58$ was added to the pectin solutions (Fu & Rao, 2001). The solutions were immediately loaded onto the rheometer cone-plane geometry and G' and G'' shear modulus at 1 Hz and 0.001% strain were monitored. The strain was determined by a strain sweep test from 0.0001 to 10%. The frequency was determined by a frequency sweep test from 0.01 to 100 Hz performed on the gels after its formation to determine and compare the storage and loss moduli (G' and G'' , respectively). Rheological measurements were performed in three replicates.

2.3 Antiradical activity measurements

2.3.1 DPPH• free radical scavenging activity

Several amounts of pectin powder (from 0.5 to 40 mg) were added into the cuvette filled with the solution containing DPPH• radicals (6.10^{-5} M) resulting in a final concentration of 0.5-40 mg/ml of pectin. After incubation for 30 min at room temperature in the dark, the absorbance (A_i) at 517 nm was measured using an UV-Vis spectrometer (Shimadzu UV-1605) against a blank without pectin, according to the slightly modified method of (Guo et al., 2015). The scavenging ability was calculated by the Equation 1:

Equation 1: DPPH• Scavenging ability (%) = (1 – Abs sample /Abs control) x100

The EC₅₀ value, which expressed the antioxidant concentration required to reduce the radicals by 50%, is a good indicator to quantify the antioxidant capacity. Each value represents the average ± standard deviation of three independent experiments.

2.3.2 ABTS^{•+} radical cation decolorization assay

The ABTS^{•+} radical scavenging activity method was based on the ability of one compound to quench the ABTS^{•+} radical cation. ABTS^{•+} species were produced by the reaction between ABTS (7 mM) and potassium persulfate (2.45 mM) in ratio 1:1 dissolved in water. The mixture was kept in the dark overnight, and then diluted with ethanol until an absorbance of 0.7 ± 0.25 at 734 nm was obtained. Several concentrations varying from 0.5 to 20 mg/ml of pectin solubilized in distilled water were mixed with 1 ml of ABTS^{•+} solution. After 30 min in the dark at room temperature, the absorbance at 734 nm was measured (Re et al., 1999) and the scavenging capability was calculated using the Equation 2:

Equation 2: ABTS^{•+} radical scavenging activity (%) = (1 – Abs sample /Abs control) x100

ABTS^{•+} radical scavenging activity was expressed as EC₅₀ value, which corresponded to the antioxidant concentration capable of reducing 50% of the ABTS^{•+} radicals. All analyses were carried out in triplicate; results represented the mean values with standard deviation.

2.4. Statistical analysis

The experimental results were performed in triplicate. The data were recorded as means ± standard deviation (SD) and analyzed by SPSS (version 11.5 for Windows 2000, SPSS Inc.). One-way analysis of variance was performed by ANOVA procedures. Significant differences between means were determined by Duncan's Multiple Range tests. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical properties of pectin derivative

3.1.1 Thermal analysis

Thermal analysis of polymers provides characteristic data related to time and temperature. The determination of temperature and heat flows associated with thermal transitions give useful information about the properties and the end-use performances of materials. In the present study, thermal analyses were performed to characterize pectin powders, in order to evaluate the effect of functionalization on the molecular arrangement of pectin chains and their interactions. Differential scanning calorimetry (DSC) was used to study thermal transitions occurring in the course of heating of pectin powders. A first run from 0 to 200 °C was made to remove all traces of water. Indeed, as shown by several authors, a peak around 100 °C was attributed to water evaporation, in citrus pectin samples (Einhorn-Stoll, Kunzek, & Dongowski, 2007). Similar results were obtained with sugar beet pectin (Combo et al., 2013), apple peel pectin (Godeck, Kunzek, & Kabbert, 2001; Monfregola, Bugatti, Amodeo, De Luca, & Vittoria, 2011) and products containing pectin (Osorio, Carriazo, & Barbosa, 2011). Results obtained after the second run of heating are shown in Table 1. Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant.

Table 1: Temperatures of thermal transitions in native pectin and in pectin grafted with phenolic compounds

DSC analysis	T _g (°C)	T _c (°C)	T _m (°C)
Native pectin	60 ^a	-	180 ^a
Modified pectin	48 ^b	130	160 ^b

T_g: glass transition temperature. T_c: crystallization temperature. T_m: melting temperature. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Values not followed by the same letter in each column are significantly different at the 0.05% level (Duncan's test).

For the native pectin, a glass transition was observed at 60 °C against 48 °C for the modified pectin ($p < 0.05$). These results appeared somewhat higher than the glass transition temperature of low or high methoxyl pectins (37 °C) reported by (Iijima, Nakamura,

Hatakeyama, & Hatakeyama, 2000). A weak exothermic peak corresponding to crystallization was observed in the pectin grafted with phenols at 130 °C whereas no similar transition was detected in native pectin. Such results suggested that pectin became under an amorphous form once the crystalline pectin was melted (Iijima et al., 2000). The endothermic peak observed at 180 °C and 160 °C in native and modified pectin, respectively, was ascribed to the melting transition phase. These results were consistent with those described by other authors who found a melting temperature of citrus pectin around 180 °C (Pereira, Carmello-Guerreiro, & Hubinger, 2009), at 200 °C (Osorio et al., 2011), or at 152 °C (Iijima et al., 2000). Moreover, several exothermic peaks were found from 180 °C for the modified pectin and 225 °C for the native one. These peaks were attributed to the degradation of the polymer followed by the elimination of volatile products. At such temperatures, the degradation was primarily derived from pyrolytic decomposition and decarboxylation pathways (Calce, Bugatti, Vittoria, & De Luca, 2012).

In view of these results, the pectin grafted with phenols appeared as a less organized polysaccharide compared with the native pectin. This was explained by the incorporation of phenolic entities that might disorder, and then destabilize the overall structure of the polymer. Phenolic entities were suspected to increase the free volume between the polysaccharide chains, thus limiting their interactions. Depending on target applications, the thermal behavior of the pectin grafted with phenols could be either an advantage or a limitation, when compared to the native polysaccharide.

3.1.2 Morphology analysis

Morphological analysis is considered as an efficient method to study the shape of particles, and then to explain their behavior and some of their physicochemical properties. The morphology of pectin particles was shown in Figure 1.

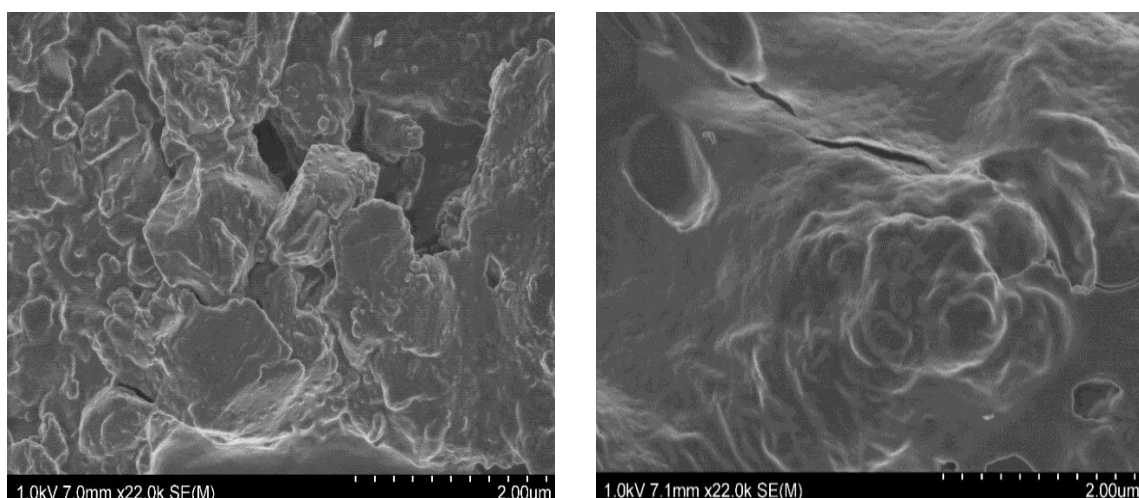


Figure 1: Scanning Electron Micrograph of native pectin (on the left) and pectin grafted with phenols (on the right)

According to the SEM images, the native pectin exhibited a rough surface contrary to the pectin grafted with phenols that presented a smooth surface. These observations highlighted the impact of the functionalization of pectin on the organization of the polysaccharide chains.

Similar findings were reported in the case of starch granules functionalized through an enzymatic esterification process (Lin, Li, Long, Su, & Huang, 2015). Grafting of rosin acid occurred in the non-stereotyped area of starch and inside the crystalline regions making the granules less organized. The morphology as well as the crystallinity of starch was affected by the structural modifications brought to the polysaccharide.

3.1.3 Water sorption isotherms

Phenolic compounds are known to present a hydrophobic character. Their grafting onto the pectin hydrophilic chains was expected to affect the affinity of the polysaccharide for water as well as the overall structure of the polysaccharide. Moisture sorption isotherms of native and modified pectin powders were determined (Figure 2).

The isotherm profile is conventionally divided into three zones. The first one corresponding to the monolayer strongly bound water, this zone usually gives an idea of the hygroscopic character of the substance. The second zone attributed to the linear region of capillary adsorbed water which was more loosely bound, and in the third zone excess free water

was present in macrocapillaries (Mathlouthi, 2001; Saad et al., 2014). The profile obtained with the native pectin was a slight sigmoid that reflected a Type II isotherm suggesting a growing equilibrium moisture content with increasing water activity according to the classification of (Brunauer, Deming, Deming, & Teller, 1940; Ricardo, Andrade, Lemus M, Carmen, & Perez, 2011). The pectin grafted with phenols presented a J-shaped type III isotherm, that accounted for a plasticizer effect of water at high a_w values (Andrade P., Lemus M., & Pérez C., 2011). The monolayer moisture content (M_0) gave a good representation of the hygroscopic behavior of polymers. It could be determined graphically as the tangent to the adsorption curve when the first layer of water saturated all the sites of pectin ($0.0 < a_w < 0.1$). M_0 of the modified pectin was lower (1.9 g/100 g dry bases) than that of the native pectin (5 g/100 g dry bases); suggesting the presence of less sorption sites accessible to water in modified pectin and thus a less hygroscopic nature. These data were consistent with the fact that the pectin grafted with phenols was somewhat more hydrophobic than the native one. Furthermore, native pectin particles have a larger specific surface (rough surface) capable of adsorbing more water than that of the modified pectin particles (smooth surface).

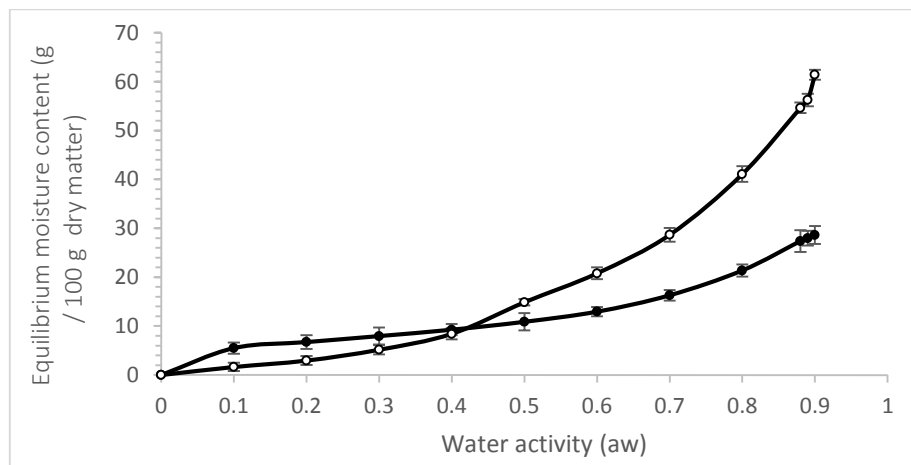


Figure 2: Sorption isotherm profiles obtained for the native pectin (●) and the pectin grafted with phenols (○), estimated at 25 °C, from 0 to 0.9 of water activity

In addition, a transformation of the material of modified pectin seemed to occur above the critical a_w value of 0.45. The isotherm profile suggested a change from the amorphous glassy

state to the amorphous rubbery state. At high a_w values, the growing capacity of the modified pectin to absorb water could be explained by the open structure of the polysaccharide. As a plasticizer, the water molecules can be inserted between the polymer chains, thereby increasing the free volume and weakens the interchain interactions (Basu, Shivhare, & Muley, 2013; Roos & Karel, 1990). On the contrary, the native pectin seemed to maintain its structure when increasing water activity.

Some authors correlated the capacity of pectin to bind water with the degree of esterification (DE). Wallingford & Labuza, 1983 found that low methoxyl pectin absorbed more water than high methoxyl pectin for a given water activity. This result was inconsistent with other studies reporting an opposite trend (Panchev, Slavov, Nikolova, & Kovacheva, 2010; Tsami, Vagenas, & Marinou-Kouris, 1992). These contradictory results suggested that no direct correlation existed between the DE and the water adsorption capacity of pectin. In our case, the DE of the modified pectin was higher than that of the native polysaccharide due to the grafting of phenolic compounds. Considering the hydrophobic nature of phenols, the less hygroscopic nature of the modified pectin appeared as a logical consequence of its higher DE.

In the present study, the functionalization of pectin with phenols led to a less hygroscopic polysaccharide at low water activities. This could constitute an advantage for storage. For higher water activities, the less compact organization of the modified pectin compared to the native one allowed water to act as a plasticizer, thus facilitating the dispersion of the polysaccharide.

3.1.4 Rheological measurements

3.1.4.1 Viscosity of pectin solutions

The viscosity of the two pectin solutions decreased with increasing the shear rate. This was caused by the random coil of pectin polysaccharide, demonstrating a shear-thinning character, with a flow behavior index (η) lower than 1 (Figure 3). Hence, native and modified

pectin were considered as pseudoplastic fluids (L. Liu, Cao, Huang, Cai, & Yao, 2010; X. Wang, Chen, & Lü, 2014; Zhang et al., 2013).

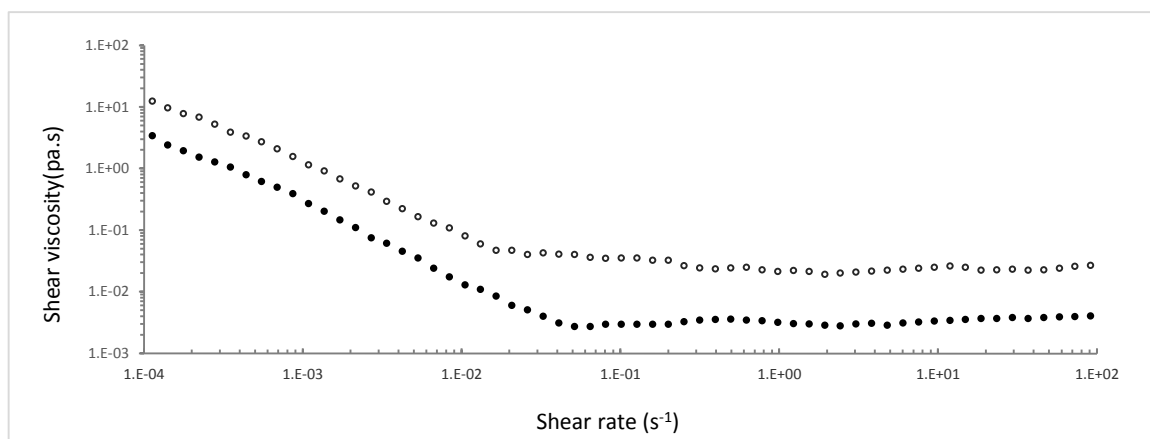


Figure 3: Variation of the shear viscosity depending on the shear stress for native (○) and modified pectins (●) (1% w/v in water). Viscosities were measured at 25 ± 1 °C with cone-plate geometry (50 mm, 2°), sd. was ≤ 4 %

The two curves showed differences in their flow behavior patterns. Overall, the native pectin had a slightly higher viscosities than the pectin grafted with phenols, whatever the shear rate. Furthermore, the native pectin had a shorten power-law region. At shear rates superior to $0.0325\ s^{-1}$, the native pectin started to behave like a Newtonian fluid where the apparent viscosity was relatively constant. For the modified pectin, a slightly higher resistance to shearing was observed ($0.0511\ s^{-1}$). This behavior could be explained by the presence of phenolic entities interacting within the pectin structure. Another assumption could be related to the molecular weight of the two types of pectin (Yuan, Galloway, Hoffman, & Bhatt, 2011). The shear-thinning behavior of the two solutions was a consequence of the physical disruption of chain entanglements which required time to be formed (S.-Q. Wang, Ravindranath, Wang, & Boukany, 2007).

The viscosity was also determined depending on the polymer concentration. A shear rate value of $2.78 \cdot 10^{-4}\ s^{-1}$ was chosen so that both pectins adopted a shear-thinning behavior (Figure 4). The slope in the shear thinning regions was correlated with the concentration.

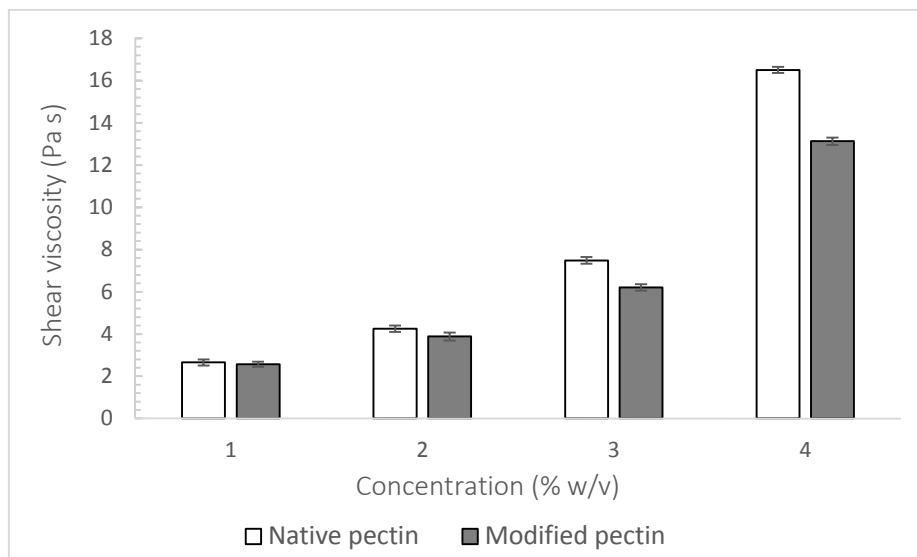


Figure 4: Shear viscosity as a function of the concentration in native and modified pectin. Viscosities were measured at 25 ± 1 °C and a fixed rotational shear rate of $2.78 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

At low concentration, the solutions prepared with the native and the modified pectins presented similar viscosities. Whatever was the pectin type, the increase of concentration led to an increased viscosity, indicating that the freedom of movement of individual chains became restricted (Morris, Cutler, Ross-Murphy, Rees, & Price, 1981; Sousa, Nielsen, Armagan, Larsen, & Sørensen, 2015). Moreover, the solution of pectin grafted with phenols became less viscous than that of the native pectin. This trend was even more pronounced as the concentration increased.

3.1.4.2 Oscillation measurements of pectin solutions

At low frequency, both types of pectin exhibited the typical behavior of polysaccharide in solution. The viscous modulus (G'') was higher than the elastic modulus (G'), indicating the predominance of the viscous properties due to the dynamic balance between pectin molecular entanglement and shearing (Figure 5).

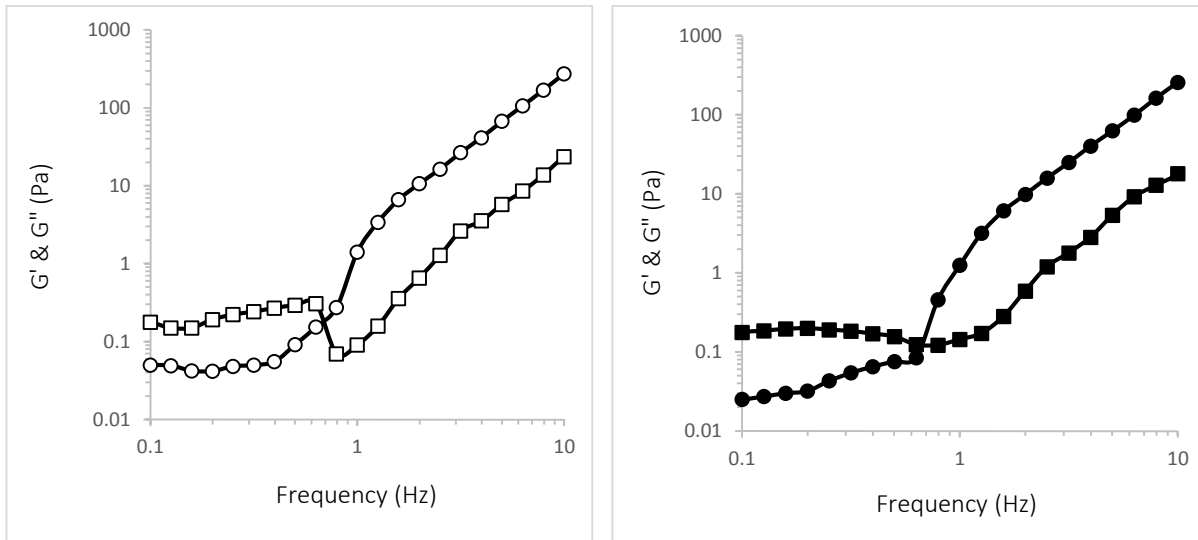


Figure 5: Variation of elastic modulus G' (● and ○) (Pa) and viscous modulus G'' (■ and □) (Pa) with the frequency (Hz) for the native (open symbols) or the modified pectin (filled symbols) at a concentration of 1% (w/v)

When the frequency increased, G'' and G' crossed, indicating the viscoelastic behavior of pectin. The crossover point indicates the exact frequency leading to elastic behavior or approaching gel state (Zhang et al., 2013). These values were similar for the two types of pectin (0.67 Hz and 0.69 Hz). The crossover point was correlated to the degree of elasticity and more particularly to the relaxation time that corresponds to the time needed to regain the original configuration (Choi, 2008). After the crossover point, G' became greater than G'' . This trend was explained by the orientation of the polymeric chains leading to a gel (Peressini, Bravin, Lapasin, Rizzotti, & Sensidoni, 2003; Piermaria, de la Canal, & Abraham, 2008; X. Wang et al., 2014).

3.1.4.3 Gelation rate determination

The influence of calcium addition on the gelation behavior of both types of pectin was studied by monitoring the evolution of the storage modulus (G') with time. The gel set time was determined as the time at which $G' > 1$ Pa.s (Urias-Orona et al., 2010).

The native pectin prepared in phosphate buffer form a gel immediately after the addition of calcium, whereas the modified polysaccharide required more time (2871 s) (Figure 6). This

result could be explained by fewer interactions between the modified pectin and calcium ions compared to the native polysaccharide, and then leading to a slow-set gelation (Löfgren, Guillotin, Evenbratt, Schols, & Hermansson, 2005). The modified pectin is particularly interesting in food industry as a gelling agent for the production of clear jellies from clarified fruit juices such as grape juice.

The difference observed in the kinetic of gel formation for the two types of pectin was explained by the chemical modifications and the subsequent conformational changes brought to the polysaccharide due to its functionalization. All these results suggested that the enzymatically modified pectin has a higher degree of methyl esterification resulting in the availability of fewer carboxyl groups to interact with calcium ions to form the egg box architecture, and thus the gel.

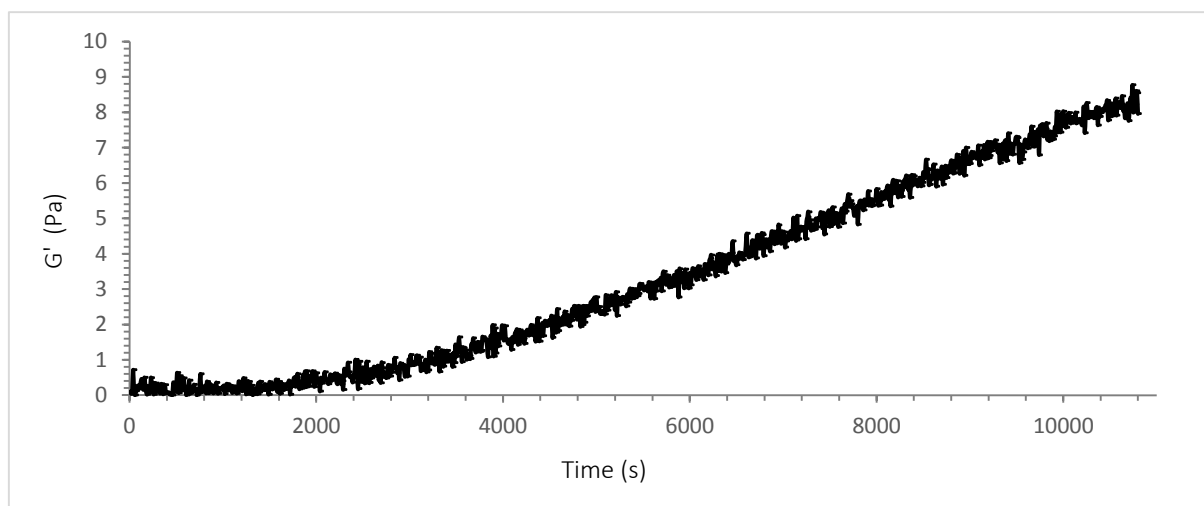


Figure 6: Variation of the storage (G') modulus versus time in a modified pectin solution (1.25% (w/v), in 0.1 N NaCl), with a volume of calcium corresponding to $R = (2 [\text{Ca}^{2+}] / [\text{COO}^-]) = 0.58$ and pH 6.5. Measurements were performed at 25 °C, 1 Hz and 0.001% strain

3.2 *In vitro* antioxidant properties

The functionalization of pectin was expected to increase its antioxidant capacity due to the incorporation of phenolic entities that can act as a hydrogen or electron donors (Li et al., 2012; Molyneux, 2004). The ability of the pectin grafted with phenols to quench radical species such as DPPH $\cdot$ and the ABTS $^{+\cdot}$ was studied and then compared to that of the native pectin. The

scavenging activity of the native and the modified pectin was shown in Table 2. Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant.

Table 2: Capacity of native and modified pectin to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} species, expressed as EC₅₀ values

	EC ₅₀ DPPH test (mg/mL)	EC ₅₀ ABTS test (mg/mL)
Native pectin	29.5 ± 0.3 ^a	116.2 ± 3.9 ^a
Modified Pectin	1.4 ± 0.2 ^b	11.2 ± 0.8 ^b

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Values not followed by the same letter in each column are significantly different at the 0.05% level (Duncan's test)

Whatever the radical species, the EC₅₀ values obtained with the modified pectin was much lower than those observed for the native pectin, indicating a higher antioxidant capacity ($p < 0.05$). This result could be explained by the grafting of phenolic entities produced from the laccase-mediated oxidation of ferulic acid. Similar results were reported in the case of other polymers grafted with ferulic acid oxidation products (Aljawish et al., 2012, 2014; García-Zamora et al., 2015). The weak antioxidant activity observed for the native pectin was attributed to few ferulic acid units naturally present in its structure.

In view of these results, the functionalization of pectin with phenols appeared as a promising way to produce new polyfunctional derivatives with improved properties that are expected to broaden the scope of polysaccharides.

4. Conclusion

In the present study, the physicochemical properties of pectin grafted with phenolic compounds were investigated and compared to those of the native pectin. This work demonstrated significant relationships between the structure of the polymer and its properties. Experimental evidence demonstrated clearly that the modification of pectin with ferulic acid oxidation products affected the organization of the polysaccharide chains and certainly also their interactions. The introduction of phenol entities within the polymer structure increased its hydrophobicity as well as its antioxidant activity and led to a looser organization. The capacity to adsorb water and the rheological properties of pectin were also affected by the

functionalization, which could be either an advantageous or a drawback, depending on the target applications. In any case, the grafting of phenols onto pectin polymeric chains allowed modulating and even improving the techno-functional properties of the polysaccharide. Thanks to its antioxidant activity and its physico-chemical properties, the modified pectin appeared as a promising polyfunctional ingredient.

5. References

- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Revol-Junelles, A.-M., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry*, 161, 279–287.
- Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J., Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 537–544.
- Andrade P., R. D., Lemus M., R., & Pérez C., C. E. (2011). Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. *Vitae*, 18(3), 325–334.
- Basu, S., Shivhare, U. S., & Muley, S. (2013). Moisture adsorption isotherms and glass transition temperature of pectin. *Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 585–589.
- Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E., & Teller, E. (1940). On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62(7), 1723–1732.
- Buchholt, H. C., Christensen, T. M. I. E., Fallesen, B., Ralet, M.-C., & Thibault, J.-F. (2004). Preparation and properties of enzymatically and chemically modified sugar beet pectins. *Carbohydrate Polymers*, 58(2), 149–161.
- Calce, E., Bugatti, V., Vittoria, V., & De Luca, S. (2012). Solvent-Free Synthesis of Modified Pectin Compounds Promoted by Microwave Irradiation. *Molecules*, 17(12), 12234–12242.
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenguer, P., & Langendorff, V. (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 901–907.
- Cheng, H. N., & Gu, Q.-M. (2012). Enzyme-Catalyzed Modifications of Polysaccharides and Poly(ethylene glycol). *Polymers*, 4(4), 1311–1330.
- Chen, J., Liu, W., Liu, C.-M., Li, T., Liang, R.-H., & Luo, S.-J. (2015). Pectin modifications: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1684–1698.
- Choi, S. K. (2008). PH Sensitive Polymers for Novel Conformance Control and Polymer Flooding (PhD thesis). University of ProQuest.
- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Quiévy, N., Danthine, S., Goffin, D., Jacquet, N., Blecker, C., Devaux, J., Paquot, M. (2013). Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 148–156.

- Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H., & Dongowski, G. (2007). Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1101–1112.
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., & Orlandi, M. (2008). Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 84–92.
- Fu, J.-T., & Rao, M. A. (2001). Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 93–100.
- García-Zamora, J. L., Sánchez-González, M., Lozano, J. A., Jáuregui, J., Zayas, T., Santacruz, V., Hernández, F., Torres, E. (2015). Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content. *Process Biochemistry*, 50(1), 125–133.
- Godeck, R., Kunzek, H., & Kabbert, R. (2001). Thermal analysis of plant cell wall materials depending on the chemical structure and pre-treatment prior to drying. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 395–404.
- Guo, M., Ma, Y., Wang, C., Liu, H., Li, Q., & Fei, M. (2015). Synthesis, anti-oxidant activity, and biodegradability of a novel recombinant polysaccharide derived from chitosan and lactose. *Carbohydrate Polymers*, 118, 218–223.
- Iijima, M., Nakamura, K., Hatakeyama, T., & Hatakeyama, H. (2000). Phase transition of pectin with sorbed water. *Carbohydrate Polymers*, 41(1), 101–106.
- Jung, J., & Wicker, L. (2012). Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 168–173.
- Kurita, O., Miyake, Y., & Yamazaki, E. (2012). Chemical modification of citrus pectin to improve its dissolution into water. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1720–1727.
- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J., & Autio, K. (2003). Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 679–684.
- Lin, R., Li, H., Long, H., Su, J., & Huang, W. (2015). Structure and characteristics of lipase-catalyzed rosin acid starch. *Food Hydrocolloids*, 43, 352–359.
- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., & Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, 101(9), 3268–3273.
- Liu, Y., Zhang, B., Javvaji, V., Kim, E., Lee, M. E., Raghavan, S. R., Wang, Q., Payne, G. F. (2014). Tyrosinase-mediated grafting and crosslinking of natural phenols confers functional properties to chitosan. *Biochemical Engineering Journal*, 89, 21–27.
- Li, W. J., Cheng, X. L., Liu, J., Lin, R. C., Wang, G. L., Du, S. S., & Liu, Z. L. (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Liriope muscari*. *Molecules*, 17(2), 1797–1808.
- Löfgren, C., Guillotin, S., Evenbratt, H., Schols, H., & Hermansson, A.-M. (2005). Effects of calcium, pH, and blockiness on kinetic rheological behavior and microstructure of HM pectin gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 646–652.
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12(7), 409–417.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211–219.
- Monfregola, L., Bugatti, V., Amodeo, P., De Luca, S., & Vittoria, V. (2011). Physical and water sorption properties of chemically modified pectin with an environmentally friendly process. *Biomacromolecules*, 12(6), 2311–2318.
- Morris, E. R., Cutler, A. N., Ross-Murphy, S. B., Rees, D. A., & Price, J. (1981). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 1(1), 5–21.
- Osorio, C., Carriazo, J. G., & Barbosa, H. (2011). Thermal and structural study of guava (*Psidium guajava* L) powders obtained by two dehydration methods. *Química Nova*, 34(4), 636–640.
- Panchev, I. N., Slavov, A., Nikolova, K., & Kovacheva, D. (2010). On the water-sorption properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 763–769.
- Pereira, L. M., Carmello-Guerreiro, S. M., & Hubinger, M. D. (2009). Microscopic features, mechanical and thermal properties of osmotically dehydrated guavas. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 378–384.
- Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C., & Sensidoni, A. (2003). Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59(1), 25–32.
- Piermaria, J. A., de la Canal, M. L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520–1527.
- Qiu, N., Tian, Y., Qiao, S., & Deng, H. (2009). Apple Pectin Behavior Separated by Ultrafiltration. *Agricultural Sciences in China*, 8(10), 1193–1202.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Ricardo, D., Andrade, P., Lemus M, R., Carmen, E., & Perez, C. (2011). Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. *Vitae*, 18(3), 325–334.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929–967.
- Roos, Y., & Karel, M. (1990). Differential Scanning Calorimetry Study of Phase Transitions Affecting the Quality of Dehydrated Materials. *Biotechnology Progress*, 6(2), 159–163.
- Saad, A., Touati, B., Draoui, B., Tabti, B., Abdenebi, A., Benaceur, S. (2014). Mathematical Modeling of Moisture Sorption Isotherms and Determination of Isothermic Heats of Sorption of *Ziziphus* Leaves. *Modelling and Simulation in Engineering*, Modelling and Simulation in Engineering, 2014, e427842.
- Sato, M. D. F., Rigoni, D. C., Canteri, M. H. G., Petkowicz, C. L. de O., Nogueira, A., & Wosiacki, G. (2011). Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivars. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3).

- Sila, D. n., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., De Roeck, A., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II—Structure–Function Relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 86–104.
- Sousa, A. G., Nielsen, H. L., Armagan, I., Larsen, J., & Sørensen, S. O. (2015). The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 47, 130–139.
- Takei, T., Sugihara, K., Ijima, H., & Kawakami, K. (2011). In situ gellable sugar beet pectin via enzyme-catalyzed coupling reaction of feruloyl groups for biomedical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(5), 491–494.
- Torres, E., Marín, V., Aburto, J., Beltrán, H. I., Shirai, K., Villanueva, S., & Sandoval, G. (2012). Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 151–158.
- Tsami, E., Vagenas, G. k., & Marinos-Kouris, D. (1992). Moisture sorption isotherms of pectins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16(3), 151–161.
- Urias-Orona, V., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A. A., & Ramírez-Wong, B. (2010). A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(10), 3686–3695.
- Van den Broek, L. A. M., & Boeriu, C. G. (2013). Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 65–72.
- Wallingford, L., & Labuza, T. P. (1983). Evaluation of the Water Binding Properties of Food Hydrocolloids by Physical/Chemical Methods and in a Low Fat Meat Emulsion. *Journal of Food Science*, 48(1), 1–5.
- Wang, S.-Q., Ravindranath, S., Wang, Y., & Boukany, P. (2007). New theoretical considerations in polymer rheology: Elastic breakdown of chain entanglement network. *The Journal of Chemical Physics*, 127(6), 064903.
- Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129–137.
- Yuan, M., Galloway, J. A., Hoffman, R. J., & Bhatt, S. (2011). Influence of molecular weight on rheological, thermal, and mechanical properties of PEEK. *Polymer Engineering & Science*, 51(1), 94–102.
- Zaidel, D. N. A., Chronakis, I. S., & Meyer, A. S. (2012). Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 130–140.
- Zaidel, D. N. A., & Meyer, A.-S. (2013). Oxidative enzymatic gelation of sugar beet pectin for emulsion stabilization. *Research Journal of Biotechnology*, 8(7), 81–86.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., & Liu, D. (2013). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 222–231.

II.3 Contribution de l'article

Cette étude était consacrée à l'étude des propriétés physicochimiques d'une pectine modifiée par greffage de composés phénoliques selon un protocole développé au laboratoire et appliqué au chitosane par Aljawish et al., (2012).

Les propriétés de la pectine modifiée ont été évaluées et comparées à celles de la pectine native, dans le but de vérifier l'impact de la fonctionnalisation enzymatique du polysaccharide sur ses propriétés techno-fonctionnelles. Les propriétés concernées dans cette étude sont : les propriétés thermiques, la morphologie de la surface, l'hygroscopie, la rhéologie, et l'activité antioxydante.

Les analyses thermiques ont montré que le greffage de composés phénoliques sur la pectine augmente le volume mort entre les chaînes de polymère et diminue leurs interactions, conduisant à une désorganisation de la structure de la pectine.

Les analyses de morphologie de la surface ont montré que des petits changements dans la structure chimique de la pectine (faible greffage de phénols) induisent des modifications des caractéristiques de la surface des particules de pectine, qui passe de rugueuse dans le cas de la pectine native à lisse dans le cas de la pectine modifiée.

Des mesures de sorption de l'eau ont permis de mettre en évidence que la pectine modifiée est moins hygroscopique que la pectine native à des activités de l'eau inférieure à 0,45. Cela pourrait constituer un avantage pour le stockage de la pectine sous forme de poudre. A des activités d'eau élevées, la structure de la pectine adopte une structure ouverte capable d'absorber des quantités importantes d'eau agissant alors comme un plastifiant.

Les mesures de la viscosité ont montré que les pectines native et modifiée ont un profil rhéofluidifiant, avec une viscosité légèrement plus importante pour la pectine native par rapport à

la pectine modifiée. Les mesures de cisaillement oscillatoire de deux solutions de pectines ont montré un comportement viscoélastique, caractérisé par des fréquences de « crossover » similaires pour les deux types de pectine. Le suivi du temps de gélification après addition de calcium a montré que la pectine native gélifie instantanément tandis que la pectine modifiée nécessite un temps de gélification.

Enfin, les mesures du pouvoir antiradicalaire de la pectine native et modifiée ont montré que le greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique augmente l'activité antioxydante du polysaccharide.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer l'existence d'une relation entre la structure de la pectine et ses fonctionnalités. Ainsi, le greffage de composés phénoliques a permis de moduler certaines propriétés de la pectine et de lui conférer une activité antioxydante significative. Ceci apparaît donc comme une voie prometteuse pour élargir le champ d'application de la pectine en tant qu'ingrédient multifonctionnel.

III. Chapitre III : Fonctionnalisation de la pectine par adsorption de composés phénoliques

III.1 Introduction

Les chapitres précédents ont présenté d'une part la fonctionnalisation enzymatique de la pectine par greffage covalent des produits d'oxydation de l'acide férulique et d'autre part l'impact de cette modification sur les propriétés physicochimiques du polysaccharide. Dans ce travail, une deuxième stratégie de fonctionnalisation a également été envisagée, basée sur l'adsorption physique des produits d'oxydation de l'acide férulique (fonctionnalisation non-covalente). Cette méthode consiste à générer des produits d'oxydation en l'absence de pectine puis à les mettre en présence du polymère pour obtenir une pectine fonctionnalisée de façon non-covalente (pectine-POX). Une comparaison des propriétés physicochimiques des deux types de polymère (pectine-F et pectine-POX) permettra de déterminer la stratégie de fonctionnalisation la plus appropriée au regard des applications visées.

Le chapitre qui suit présente les résultats relatifs aux caractéristiques structurales et physicochimiques de la pectine-POX : le taux de composés phénoliques adsorbés, la couleur, la mobilité électrophorétique, le comportement rhéologique, l'hygroscopie, les propriétés thermiques et enfin l'activité antioxydante du polymère. Les résultats seront confrontés à ceux obtenus avec la pectine-F.

III.2 Caractérisation structurale de la pectine-POX

III.2.1 Analyse structurale par spectroscopie UV-Visible

Des différences significatives sont observées dans les spectres UV / Vis des trois catégories de pectine (pectine native, pectine-F et pectine-POX) (Figure 25). En particulier, des absorbances importantes à 280 nm et dans la région 300-340 nm, dues à la présence de composés phénoliques,

sont observées dans le cas de pectine-POX et pectine-F (Holser, 2014). Les plus fortes absorbances mesurées pour la pectine-F par rapport à la pectine-POX suggèrent un taux d'incorporation de composés phénoliques plus important dans le cas de la fonctionnalisation covalente du polysaccharide (*Cf* ce travail). Les faibles absorbances obtenues dans la région 300 – 340 nm pour la pectine native reflètent la nature faiblement féruloylée du polysaccharide.

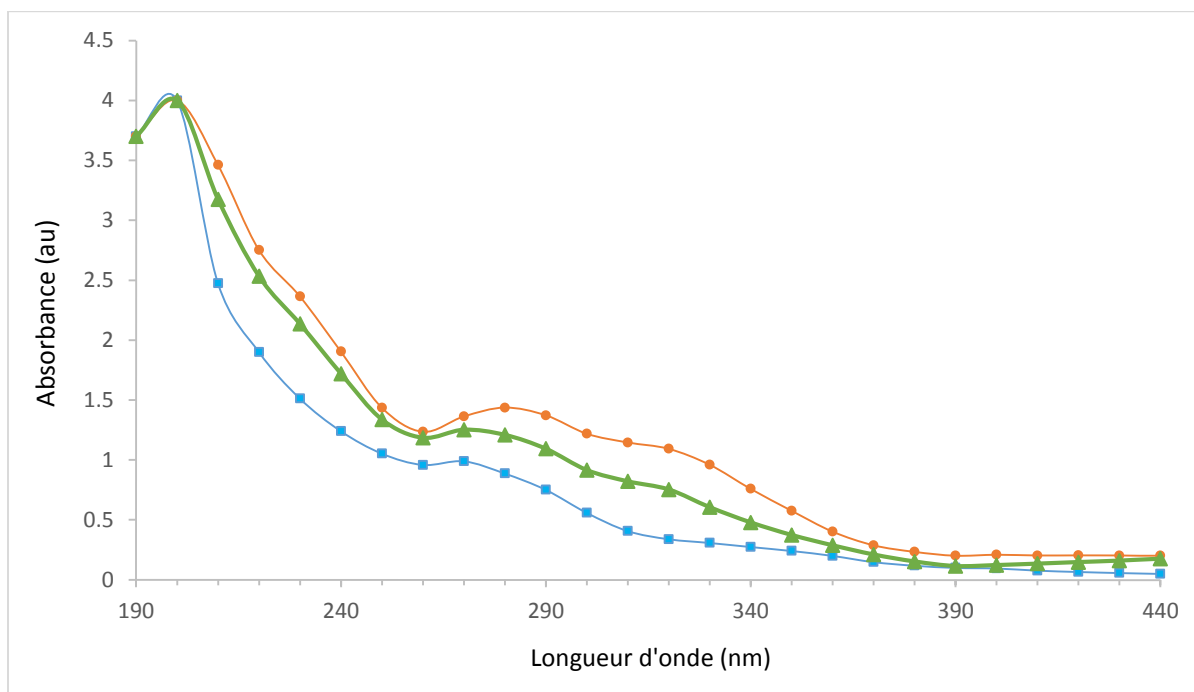


Figure 25 : Spectres UV/ visible de la pectine native (bleu ■), la pectine-F (orange ●) et la pectine-POX (vert ▲) à 1 g/l dans l'eau distillée

III.2.2 Analyse structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Le spectre FTIR de la pectine-POX a révélé la présence des pics caractéristiques des groupements fonctionnels de la pectine. Dans la région 3420 - 3430 cm^{-1} une large bande asymétrique est observée, correspondant aux fonctions hydroxyles du polysaccharide (zone du spectre éliminée). Entre 1550 cm^{-1} et 2500 cm^{-1} , les pics relatifs à l'élongation des liaisons carbonyle peuvent être observés (Figure 26). Un degré d'esterification de 28 % est observé pour

la pectine-POX. Les deux bandes à 1370 et 1440 cm^{-1} sont liées aux déformations internes du groupement méthyl ester. Dans la région autour de 900-1200 cm^{-1} , l'absorption de la liaison C-O ainsi que des liaisons du noyau aromatique est observée. La région des empreintes digitales en dessous de 900 cm^{-1} est caractéristique pour chaque composé (Panchev, Slavov, Nikolova, & Kovacheva, 2010). Le spectre de la pectine-POX, de la pectine-F et de la pectine native diffèrent notamment au niveau de la surface des pics relatifs à l'élongation C=O des fonctions carboxyles, indiquant différentes disponibilités de ces groupements au sein des polymères, et une modification de la structure chimique de la fonction acide pour la pectine-POX.

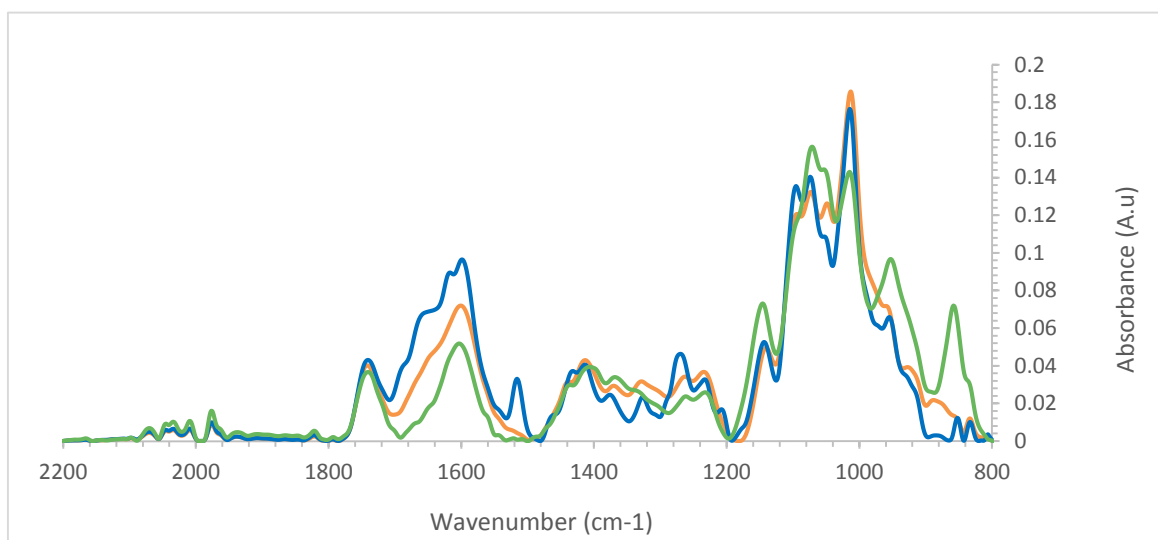


Figure 26 : Spectres FTIR de la pectine native (bleu), la pectine-F (orange) et la pectine-POX (vert)

III.2.3 Analyse structurale par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Pour caractériser les changements structuraux apportés aux chaînes de pectine au cours de sa fonctionnalisation, la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a été utilisée. Des analyses ont été réalisées sur les pectines -F et -POX. La pectine native et les produits d'oxydation de l'acide férulique (POX) ont été analysés en guise de référence. L'attribution des signaux des atomes d'hydrogène et de carbone des unités d'acide galacturonique dans la pectine native est

donnée dans l'article 1 (Cf section NMR analyses). En comparaison à la pectine native, l'analyse du spectre RMN ^1H a montré que :

- (i) Le doublet à 1.15 ppm observé dans le spectre de la pectine native est sous la forme d'un triplet ou d'un quadruplet dans celui de la pectine-POX ; à 4.5 ppm l'intensité du doublet est plus faible et un nouveau pic est apparu dans cette zone. Ceci indique que l'environnement des atomes d'hydrogène H_1 du galactose est modifié dans pectine-POX.
- (ii) De nouveaux signaux sont observés dans la région aromatique du spectre (6.0-8.0 ppm) ce qui est une indication de la présence d'entités phénoliques dans l'échantillon de pectine-POX.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C , a montré l'apparition d'un nouveau pic à 50 ppm qui est attribué au groupement OCH_3 de l'acide férulique ou de l'acide galacturonique méthylé.

Des analyses de RMN 2D HSQC ont également été effectuées, montrant des différences entre les spectres des différentes pectines mais celles-ci demeurent difficiles à exploiter.

Pour résumer, des différences ont été observées entre la pectine native et les pectines modifiées (pectine-F et pectine-POX) qui elles-mêmes, diffèrent l'une de l'autre. Ces observations ont amené à conclure que des modifications structurales ont lieu au cours de la fonctionnalisation de la pectine. Toutefois celles-ci se révèlent difficiles à exploiter.

III.2.4 Morphologie de la surface

La morphologie des particules de la pectine native et de ses formes dérivées (pectine-F et pectine-POX) observée par microscopie électronique à balayage est présentée dans la Figure 27. Contrairement à la surface rugueuse de la pectine native, la pectine-F présente une surface lisse et la pectine-POX une surface écailleuse.

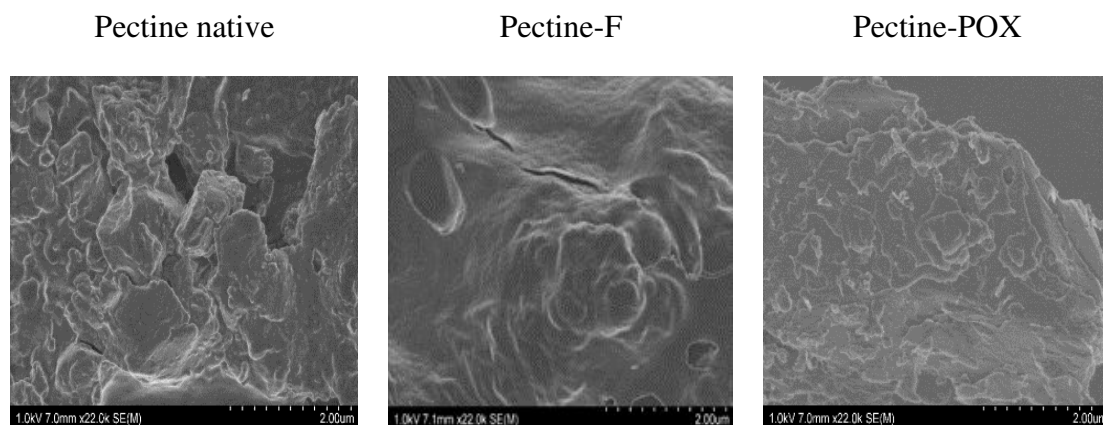


Figure 27 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage des pectines native et modifiées (pectine-F et pectine-POX), agrandissement à 2 µm

L'analyse MEB indique que la méthode de greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine, n'altère pas seulement la structure de la pectine, mais aussi ses caractéristiques de surface. L'utilisation de la laccase dans un greffage enzymatique direct aboutissant à la pectine-F a rendu la surface lisse. Ce résultat est en accord avec Dong et al., (2015) qui ont montré qu'après le traitement de fibres de jute avec de la laccase pour greffer l'octadecylamine, leur surface devenait lisse. Les changements morphologiques observés avec les dérivés de la pectine ont été attribués à des effets de la réaction de fonctionnalisation. Ces conclusions sont en accord avec celles obtenues par (Lin, Li, Long, Su, et Huang, 2015) qui ont montré que la morphologie de surface de l'amidon est affectée lorsque le polysaccharide est estérifié. D'après les résultats obtenus, la présence de composés phénoliques greffés de façon covalente au sein de la structure de la pectine permettrait de lisser la surface du polymère comme si les produits d'oxydation jouaient le rôle de plastifiant. Ce phénomène est beaucoup moins marqué lorsque les composés phénoliques sont simplement adsorbés sur la pectine. Dans ce cas, la

surface de la pectine-POX est squameuse, se situant ainsi entre la surface rugueuse de la pectine native et la surface lisse de la pectine-F.

III.3 Caractérisation physicochimique de la pectine-POX

III.3.1 Détermination de la quantité de phénols total

La teneur en composés phénoliques dans les pectines sous forme native et modifiée a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu en utilisant l'acide gallique comme étalon. Les résultats du tableau 8 montre que la pectine POX (32,6 +/-1,2 mg Gal Eq/g MS) est trois fois plus riche en phénols que la pectine native (9,9 +/- 0,8 mg Gal Eq/g MS). Ceci suggère que les phénols sont fortement adsorbés à la pectine POX, du fait qu'ils n'ont pas été éliminés au cours de la procédure de lavage de la poudre de pectine. Ceci a été vérifié en traitant les échantillons par de l'urée et un chauffage à 70 °C pendant 60 min pour déstabiliser toutes les liaisons faibles établies entre les composés phénoliques et la pectine. Malgré ce traitement drastique, la pectine-POX contient toujours davantage de phénols que la pectine native (données non présentées). Cela confirme que les phénols sont fortement adsorbés à la pectine.

D'autre part, la comparaison des résultats obtenus avec les pectines modifiées montre que la pectine-F (54.7 +/- 0.3 mg Gal Eq/g MS) est plus riche en phénols que la pectine-POX.

Tableau 8 : Détermination de la teneur en phénol dans la pectine native et ses dérivées

Echantillons	Concentration de phénols en mg d'équivalent acide gallique /g de matière sèche
Pectine native	9,9 +/- 0,8
Pectine-F	54,7 +/- 0,3
Pectine-POX	32,6 +/- 1,2

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ écart-type de trois expériences indépendantes

III.3.2 Mesure de la Couleur

La poudre de pectine-POX étant colorée, une mesure de couleur a été réalisée. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec la pectine native et la pectine-F. Le ΔE de la pectine-F est égale à $26,3 \pm 0,6$ alors que celui de la pectine-POX est égale à $25,2 \pm 0,7$. On en conclut que les pectines modifiées ont des couleurs différentes. Pour rappel, la pectine native présente quant à elle une couleur blanc-crème.

D'autre part, l'intensité de la coloration des poudres représentée par le paramètre chroma C^* du système CIELab a été calculée. La pectine-POX ($25,2 \pm 0,7$) a une couleur plus intense que la pectine native ($13,1 \pm 0,7$) mais moins intense que la pectine-F ($28,5 \pm 0,1$) (Figure 29). L'intensité de la couleur des échantillons est corrélée à leur teneur en composés phénoliques parce que les produits d'oxydation de l'acide férulique sont colorés (Aljawish, Chevalot, Jasniowski, Paris, et al, 2014; Mustafa, Muniglia, Rovel, et Girardin, 2005). Ceci signifie que la pectine-F ayant la plus forte teneur en phénols aura la plus haute intensité de couleur. Par ordre d'intensité de couleur, viennent ensuite la pectine POX puis la pectine native (Figure 28).

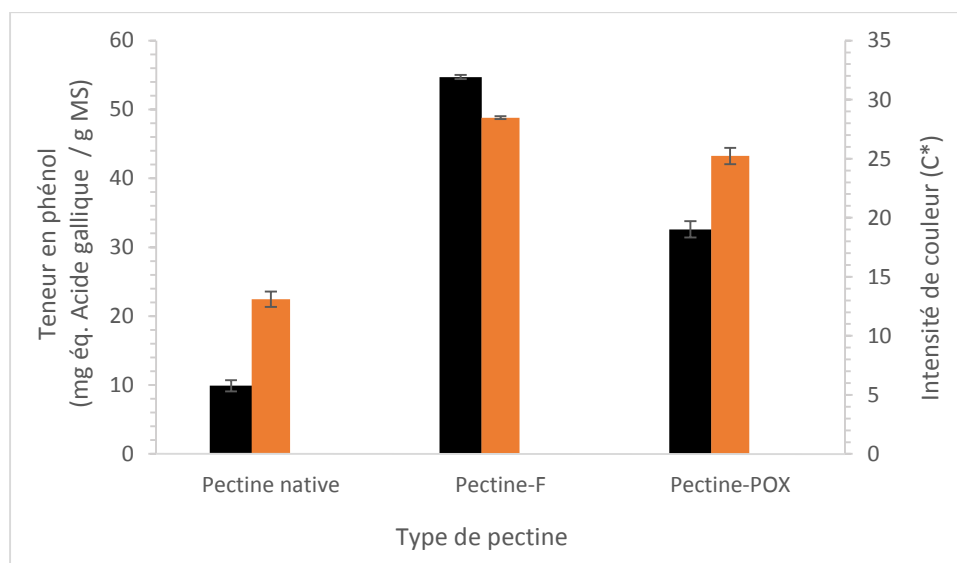


Figure 28 : Corrélation de l'intensité de couleur de la pectine native et des pectines modifiées à leur teneur en phénols

III.3.3 Mobilité électrophorétique

Une mesure de la mobilité électrophorétique des solutions de pectine a été effectuée à 25 ° C, pH 4,5 et à une concentration de 1 % (p / v) dans l'eau. La mobilité électrophorétique des pectines modifiées est inférieure à celle de la pectine native (-2,0 +/- 0,2 $\mu\text{m.cm/Vs}$). Ces valeurs sont négatives du fait que la pectine est chargée négativement grâce à ses groupements carboxyles. En outre, on observe que la diminution de la mobilité électrophorétique de la solution de pectine F (-1,5 +/- 0,2 $\mu\text{m.cm/V.s}$) est plus élevée que celle de la solution de pectine POX (-1,7 +/- 0,2 $\mu\text{m.cm/V.s}$). D'après les résultats montrés précédemment, le greffage covalent des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine-F bloquerait les groupements carboxylates, ce qui pourrait expliquer la diminution importante de la mobilité électrophorétique. Concernant, l'adsorption des produits d'oxydation sur la pectine-POX, les résultats suggèrent que les composés phénoliques peuvent interagir avec la pectine, probablement par le biais d'interactions électrostatiques et de type π - π stacking.

III.3.4 Isothermes de sorption de l'eau

Les isothermes de sorption de l'eau de la pectine native, de la pectine-F et de la pectine POX ont été déterminées à 25 ° C, en fonction d'une humidité relative allant de 0 à 90 % (Figure 29). Ces isothermes montrent une augmentation non linéaire de la teneur en humidité des échantillons avec l'augmentation de l'activité d'eau.

La pectine native présente une isotherme de type II avec une allure sigmoïdale alors que la pectine F et la pectine POX donnent une isotherme de type III correspondant à une isotherme d'adsorption avec hystérésis selon la classification de Brunauer et al. (1938) et Ricardo et al. (2011). Une isotherme de type II comporte trois phases. Au cours de la première phase, les groupements polaires d'énergie de liaison élevée sont saturés avec des molécules d'eau (couverture monocouche). Au cours de la deuxième phase, des molécules d'eau supplémentaires sont liées à la

monocouche (formant une couverture multicouche) et des clusters d'eau commencent à se former. Au cours de la troisième phase, l'eau s'accumule dans les espaces libres intermoléculaires ce qui entraîne un gonflement partiel, qui à son tour peut exposer des sites de liaison hydrophiles supplémentaires (Mohamad Saad et al., 2009). Une isotherme type III présente seulement les deux dernières phases.

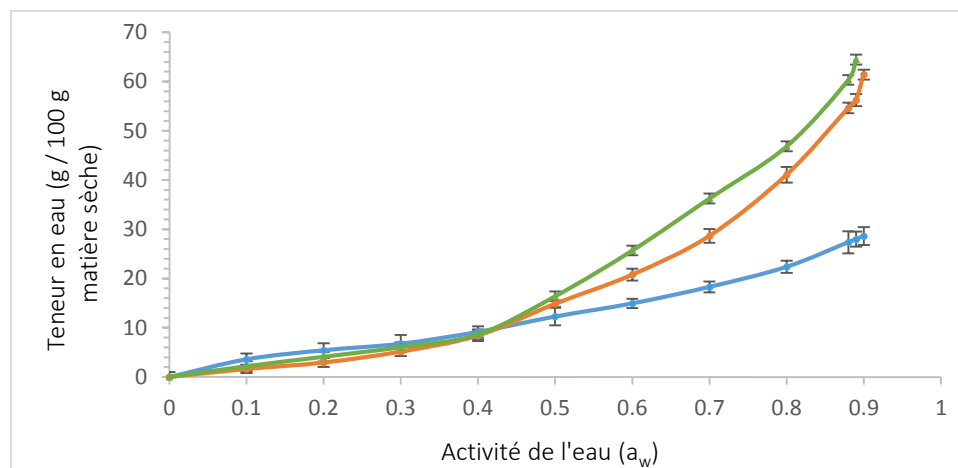


Figure 29 : Isothermes de sorption obtenues pour la pectine native (bleu), la pectine-F (orange) et la pectine-POX (vert), à 25 °C

L'allure des isothermes de sorption montrent un changement de comportement à une activité de l'eau de 0,45 dans le cas de la pectine-F et de la pectine-POX. Pour des a_w inférieurs à 0,45, les pectines modifiées adsorbent moins d'eau que la pectine native. On en déduit qu'elles sont moins hygroscopiques que la pectine native. Ceci s'explique par la présence de composés phénoliques hydrophobes dans leur structure. En revanche, à des a_w supérieures à 0,45, la pectine native absorbe moins d'eau que les pectines -F et -POX. A une a_w de 0,90 c'est la pectine-POX qui présente la plus forte teneur en eau. Cette rétention d'eau rend la pectine-POX plus facile à disperser et plus stable vis-à-vis de l'aggrégation que les autres pectines étudiées. Ceci s'explique par la présence des groupements phénoliques adsorbés à la surface de la pectine-POX. L'insertion de ces derniers entre les chaînes de pectine augmente le volume mort inter-chaîne et fait apparaître des cavités capables

d'accumuler de l'eau. La pectine-F, quant à elle, présente également des groupements phénoliques intercalés entre les chaînes polysaccharidiques. Une rétention d'eau peut ainsi également avoir lieu mais celle-ci est moindre par rapport la pectine POX. Enfin, les résultats suggèrent que la seule présence de composés phénoliques au sein de la structure de la pectine ne suffit pas à expliquer les phénomènes observés. Le mode de liaison de ces composés aux chaînes polysaccharidiques (liaison covalente ou adsorption) joue un rôle clé dans l'organisation et les propriétés du polymère.

III.3.5 Analyses thermiques

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été utilisée pour étudier les transitions thermiques de la pectine native et des pectines modifiées placées sous atmosphère inerte et préalablement séchées. Les résultats sont montrés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Températures de transition thermiques de la pectine native et des pectines modifiées

Température (°C)	T _g	T _c	T _f	T _d
Pectine native	60	-	180	225-300
Pectine-F	48	130	160	240-270
Pectin- POX	48	145	170	200-230

T_g: transition vitreuse. T_c: température de cristallisation. T_f: température de fusion. T_d: température de dégradation (plusieurs pics)

Une première montée en température (entre 0 et 200 °C) est effectuée dans le but d'éliminer l'eau présente dans les échantillons et ainsi s'affranchir du pic d'évaporation de l'eau dans les thermogrammes (Einhorn-Stoll, Kunzek, & Dongowski, 2007; Godeck, Kunzek, & Kabbert, 2001; Monfregola, Bugatti, Amodeo, De Luca, & Vittoria, 2011; Osorio, Carriazo, & Barbosa, 2011; Combo et al., 2013).

Au cours de la deuxième montée en température, la transition vitreuse est détectée à 60 °C pour la pectine native et à 48 °C pour les pectines modifiées (pectine-F et pectine-POX). Ces

valeurs suggèrent un état plus organisé et plus compact pour la pectine native par rapport aux pectines -F et -POX.

Le pic endothermique à 180 °C pour la pectine native est attribué au phénomène de fusion du polymère. Cette valeur est identique à celle mesurée par Pereira et al. (2009) qui ont également travaillé sur la pectine de citron. D'autres équipes mentionnent une température de fusion de 200 °C (Osorio et al., 2011) et 152 °C (Iijima et al., 2000). Les températures de fusion des pectines -F et -POX sont plus basses que celle du polymère natif. Par ailleurs, la pectine-POX présente une température de fusion de 10 °C supérieure à celle de la pectine-F. Les écarts de température de transition observés entre les différents types de pectine s'expliquent par la présence des groupements phénoliques qui viennent s'intercaler entre les chaînes des pectines -F et -POX provoquant une perturbation et une diminution de la cohésion du réseau polymérique. La présence des pics exothermiques de cristallisation dans le cas des pectines -POX et -F sont en accord avec les résultats des isothermes de sorption dans lesquelles les pectines modifiées présentaient des profils correspondant à une structure pseudo cristalline.

Les pics exothermiques observés au-delà de 200 °C correspondraient à la dégradation pyrolytique des polymères. Les résidus produits à l'issue de cette dégradation thermique se présentent sous la forme d'une poudre de charbon noir (Figure 30). D'après la littérature, la dégradation thermique de la pectine consiste en une décarboxylation primaire et secondaire au niveau des unités d'acide galacturonique (Calce, Bugatti, Vittoria, et De Luca, 2012).



Figure 30 : Résidu obtenu à l'issue de la dégradation thermique de la pectine

Les thermogrammes indiquent une température de dégradation inférieure pour la pectine-POX par rapport à la pectine native et la pectine-F. Ceci suggère que l'adsorption des composés phénoliques sur les chaînes polysaccharidiques déstructure partiellement le polymère et diminue sa stabilité thermique. D'autres auteurs rapportent une déstabilisation thermique de la pectine, induite par une hydrolyse enzymatique de ses fonctions esters (Combo et al., 2013).

On conclut de ces résultats que la structure des pectines -F et -POX semble moins organisée, moins compacte et moins stable que la structure de la pectine native. Ceci s'explique par l'insertion d'entités phénoliques adsorbées ou greffées (selon le mode de fonctionnalisation employé) dans le polymère. La pectine POX semble présenter un comportement thermique intermédiaire entre celui de la pectine native et celui de la pectine-F. Ceci peut être corrélé au taux de phénols incorporés et/ou au mode de liaison des entités phénoliques aux chaînes polysaccharidiques.

III.3.6 Caractérisation rhéologique

III.3.6.1 Viscosité des solutions de pectine

La viscosité des trois solutions de pectine (1 % m/v) diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement (Figure 31). Ceci démontre un comportement rhéofluidifiant qui est une conséquence de la perturbation physique de l'enchevêtrement des chaînes de polymères (S.-Q. Wang, Ravindranath, Wang, & Boukany, 2007). Par conséquence, la pectine native et les pectines

-F et -POX sont des fluides pseudoplastiques (Liu, Cao, Huang, Cai, & Yao, 2010; X. Wang, Chen, & Lü, 2014).

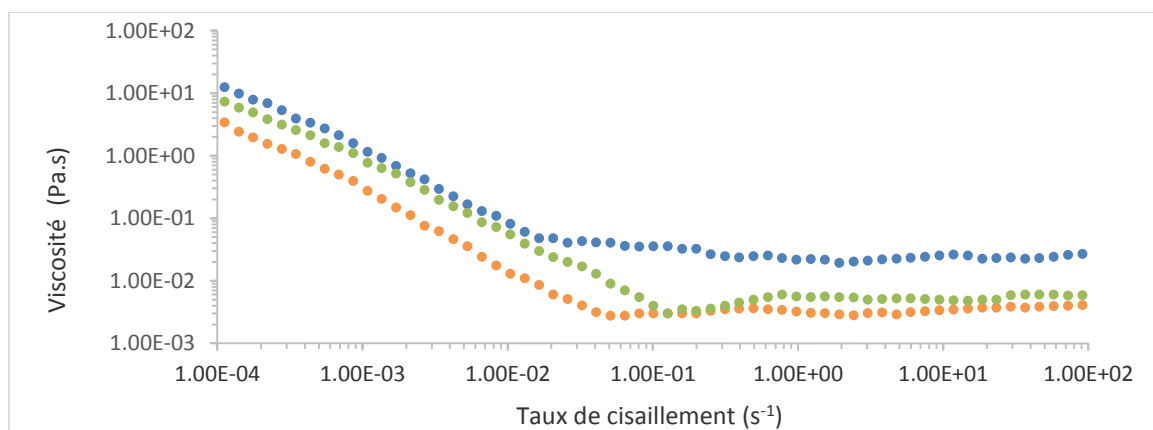


Figure 31 : Variation de la viscosité de solutions de pectine native (bleu), pectine-F (orange) et pectine-POX (vert) en fonction de la vitesse de cisaillement. La viscosité est mesurée à 25 ± 1 °C avec une géométrie cône-plan (50 mm, 2°)

Dans la zone décroissante, la pectine native conduit à une viscosité quasiment égale à celle obtenue avec la pectine-POX et légèrement supérieure à celle de la pectine-F, quelle que soit la contrainte de cisaillement. Un taux de cisaillement de $0,16 \text{ s}^{-1}$ permet d'observer le comportement newtonien de la pectine-POX. Pour rappel, des valeurs de 0,03 et 0,05 ont été obtenues pour la pectine native et la pectine-F, respectivement. La pectine-POX est donc la moins sensible au cisaillement. Ceci pourrait s'expliquer par un réseau d'interactions inter- et intra-chaîne favorisé par la présence des composés phénoliques ajoutés dans la structure de la pectine.

Une étude a permis de montrer qu'une augmentation de la concentration en pectine, entraîne une élévation de la viscosité. Ceci s'explique par le fait que lorsque la concentration augmente, l'enchevêtrement des chaînes de pectine s'accroît, conduisant à une élévation de la viscosité (Morris, Cutler, Ross-Murphy, Rees, et al., 1981; Sousa, Nielsen, Armagan, Larsen, & Sørensen, 2015). Par ailleurs, à concentration égale, la pectine-POX conduit à une viscosité similaire à celle obtenue avec la pectine native et légèrement supérieure à celle obtenue avec la

pectine-F (Figure 32). Ces résultats peuvent être corrélés au taux d'incorporation de phénols dans les pectines -F et -POX.

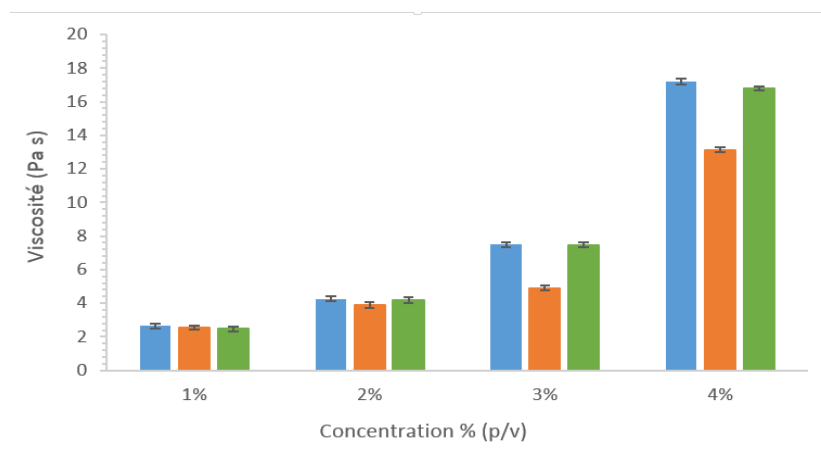


Figure 32 : Variation de la viscosité en fonction de la concentration en pectine native (bleu), pectine-F (orange) et pectine-POX (vert). Les viscosités ont été mesurées à 25 ± 1 °C et une vitesse de rotation fixe de cisaillement de $2,78.10^{-4} \text{ s}^{-1}$

III.3.6.2 Mesure de l'oscillation des solutions de pectine

Un balayage de fréquence a été effectué sur des solutions à 1 % (m/v) avec une géométrie cône-plan de 50 mm pour déterminer les modules G' et G'' . A de faibles fréquences, la pectine-POX présente le comportement typique d'une solution de polysaccharide, où G'' est supérieur à G' . Ceci indique une prédominance des propriétés de viscosité grâce à l'équilibre dynamique entre l'enchevêtrement moléculaire de la pectine et le cisaillement (Figure 33). Lorsque la fréquence augmente, G'' et G' se croisent à une fréquence de 0,66 Hz correspondant au début du comportement élastique ou un état proche du gel (Zhang et al., 2013). Cette valeur est similaire à celles observées pour la pectine native et la pectine-F (0,69 Hz). Pour des fréquences supérieures, G' devient supérieur à G'' et la pectine-POX dans cette région pourrait se comporter comme un gel (Piermaria, de la Canal, & Abraham, 2008).

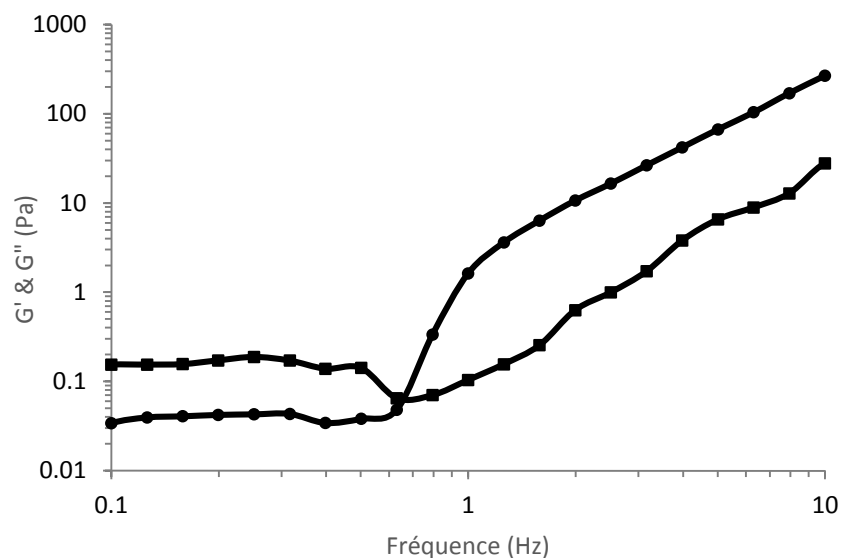


Figure 33 : Variation de la fréquence (Hz) en fonction du module élastique G' (●) et visqueux G'' (■) (Pa) de la pectine-POX

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent un degré d'élasticité et un temps de relaxation similaires pour les trois solutions de pectine. La fonctionnalisation du polysaccharide semble donc ne pas avoir d'effet sur ces caractéristiques du polymère.

III.3.6.3 Détermination du temps de gélification

L'influence de l'addition de calcium sur le comportement cinétique de gélification a été étudiée par le suivi de l'évolution du module G' en fonction du temps. Le temps de gel peut être déterminé lorsque G' est supérieur à 1. La gélification de la pectine-POX a été observée 948 s après l'addition du calcium alors que la pectine native gélifie instantanément et la pectine-F gélifie au bout de 2871 s (Figure 34). La différence de comportement des pectines vis-à-vis des ions calcium s'explique par le fait que dans la pectine native, les groupements carboxyliques sont totalement accessibles ce qui se traduit par une gélification instantanée. Dans la pectine-F, les groupements carboxylates sont moins nombreux à cause du greffage de composés phénoliques. Par ailleurs, ceux-ci provoquent un encombrement stérique au niveau des chaînes de pectine. Tout ceci conduit

à une augmentation significative du temps de gélification. Pour la pectine-POX, ces effets sont moins prononcés ce qui conduit à une cinétique de gélification intermédiaire entre celle de la pectine native et celle de la pectine-F.

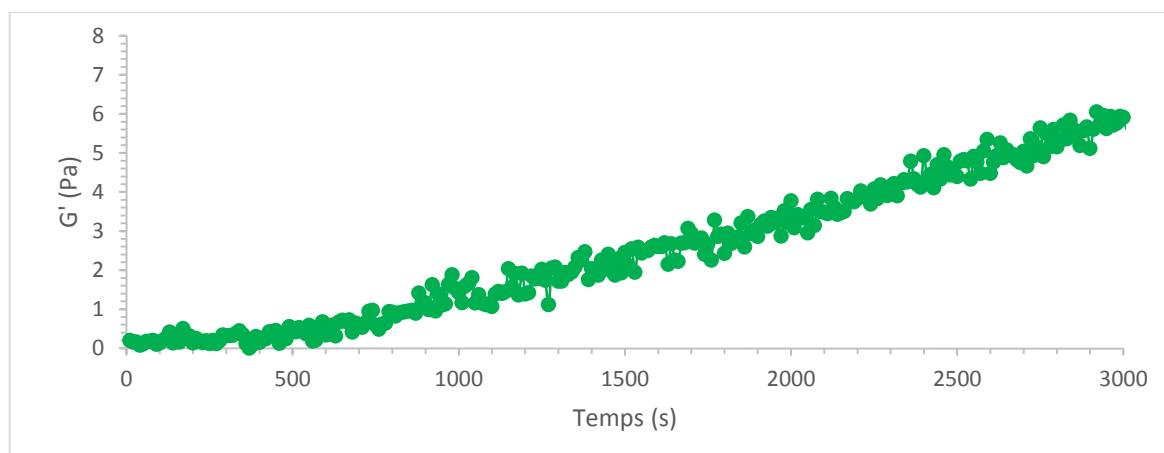


Figure 34 : Variation du module G' de la pectine-POX (1.25 % m/v) en fonction du temps. La solution est dissoute dans 0,1 N NaCl, avec un volume de calcium correspondant à $R = (2 [Ca^{2+}]) / ([COO^-]) = 0,58$ et pH 6,5. Les mesures sont faites à 25 °C, 1Hz et une force de 0,1%

III.4 Propriétés antiradicalaires de la pectine-POX

La capacité de la pectine-POX à piéger les radicaux DPPH $\cdot$ et ABTS $^{+\cdot}$ a été évaluée et comparée à celles de la pectine native et de la pectine-F. Les résultats sont présentés dans le tableau 10. Les pectines -F et -POX présentent une activité antioxydante nettement supérieure à celle de la pectine native. Ceci s'explique par l'incorporation, dans leur structure, des composés phénoliques issus de l'oxydation de l'acide férulique. Ce résultat est en accord avec des recherches sur la fonctionnalisation enzymatique d'autres polymères avec les produits de l'oxydation de l'acide férulique (Aljawish et al., 2012, 2014; García-Zamora et al., 2015). Quelle que soit l'espèce radicalaire considérée, l'activité de la pectine-F est supérieure à celle de la pectine-POX, en raison probablement de son taux de phénols plus important.

Tableau 10: Activité antioxydante de la pectine native et des pectines -POX et -F, exprimée en valeurs EC₅₀

	Pectine native	Pectine-POX	Pectine-F
Activité inhibitrice des radicaux DPPH [*] , EC ₅₀ (mg/mL)	29,5 +/- 0,3	9,0 +/- 0,1	1,4 +/- 0,2
Activité inhibitrice des radicaux ABTS ⁺⁺ , EC ₅₀ (mg/mL)	116,2 +/- 3,9	14,5 +/- 1,2	11,2 +/- 0,8

Ces résultats démontrent clairement l'intérêt de la fonctionnalisation de la pectine, que ce soit par un procédé d'adsorption ou un greffage covalent de composés phénoliques, pour produire de nouveaux polymères antioxydants.

III.5 Conclusion

Une méthode de fonctionnalisation de la pectine par adsorption de composés phénoliques issus de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique a été développée. Les propriétés de la pectine ainsi obtenue ont été étudiées et comparées à celles de la pectine native et de la pectine-F. Les analyses structurales et biochimiques ont démontré la présence de composés phénoliques incorporés dans la structure de la pectine, mais en quantité moindre par rapport à la pectine-F. Ces composés phénoliques sont supposés s'insérer entre les chaînes de pectine, entraînant la formation d'un réseau moins compact. Les conséquences sont un changement de la morphologie de surface des particules de pectine, un ralentissement de la cinétique de gélification en présence de calcium, une capacité d'absorption de l'eau aux fortes a_w accrue et des températures de transition plus faibles que dans le cas du polymère natif. En revanche, l'adsorption de phénols ne semble pas affecter la viscosité de la pectine en solution. Le caractère hydrophobe des phénols adsorbés rend la pectine-POX moins hygroscopique que la pectine native aux faibles a_w . En outre, les tests d'activité révèlent un pouvoir antioxydant nettement accru de la pectine.

La comparaison des différentes propriétés des pectines modifiées (-F et -POX), conduit à la conclusion que la pectine-POX a des applications plus vastes et plus intéressantes que la pectine-

F. En plus de son utilisation dans l'industrie alimentaire comme agent texturant et épaississant, grâce à ses propriétés rhéologiques plus importante que celles de la pectine-F ; la pectine-POX peut servir comme un additif antioxydant pour la conservation des aliments, grâce à son activité antioxydante gagnée et comme un colorant alimentaire, remplaçant les colorants synthétiques en raison de sa nouvelle couleur.

Plus généralement, ce travail a permis de montrer que non seulement le taux d'incorporation de phénols mais également le mode de liaison de ces composés à la pectine, impactent fortement la structure et par suite les propriétés du polysaccharide. Ces deux éléments (taux de phénols et mode de liaison) constituent donc des leviers intéressants pour la production de dérivés de pectine présentant des propriétés techno-fonctionnelles ciblées

IV. Chapitre IV : Assemblage des polysaccharides et vectorisation d'un principe actif

IV.1 Auto-assemblage de la pectine et du chitosane

IV.1.1 Introduction

Les microparticules font l'objet de nombreuses investigations en matière de recherche dans les domaines pharmacologique, médical, mais aussi dans certaines applications biologiques et alimentaires principalement en raison de leurs propriétés de protection et de vectorisation de biomolécules d'intérêt vers des cibles cellulaires.

La matrice formant ces microparticules peut être à base d'un ou plusieurs polysaccharides voire de protéines. Dans cette partie, nous avons étudié l'auto-assemblage de deux polysaccharides de charges opposées : la pectine et le chitosane.

L'assemblage de ces deux polysaccharides pour former des microparticules est réalisé sous des conditions douces de température (25 °C) et en milieu aqueux. Le pH choisi est celui qui assure une ionisation maximale des chaînes. Il doit être supérieur au pKa des COOH de la pectine (alors sous forme COO⁻) et inférieur au pKa des amines du chitosane (alors sous forme NH₃⁺). La valeur de pH retenue dans cette étude est de 4,5.

Cette partie est divisée en deux sous-parties : assemblage et encapsulation, afin de vérifier l'influence de la fonctionnalisation des polymères sur ces deux phénomènes. Dans la première partie, les conditions d'auto-assemblages des microparticules sont testées afin de trouver celles qui permettent d'obtenir une distribution de particules étroites. Dans la deuxième partie, la curcumine est encapsulée dans les microparticules formées dans la première partie et le taux d'encapsulation est comparé entre les différents auto-assemblages afin de déterminer l'influence de la fonctionnalisation sur ce paramètre (taux d'encapsulation).

IV.1.2 Paramètres physicochimiques des polymères

Une caractérisation physico-chimique des polymères est nécessaire pour voir l'influence de la fonctionnalisation sur ces paramètres. La mobilité électrophorétique, la taille et par suite le span des polymères natifs et fonctionnalisés sont respectivement déterminées par le Zetasizer (*Cf* chapitre matériels et méthodes) et le granulomètre laser Mastersizer 3000 (*Cf* chapitre matériels et méthodes). Les résultats sont exprimés dans les tableaux 11 et 12 ci-dessous.

Tableau 11 : La mobilité électrophorétique de la pectine (0.15 % m/v) et du chitosane (0.15 % m/v) natif (symbolisé par N) et fonctionnalisé (symbolisé par F) à un pH de 4,5

Biopolymères	Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.cm/V.s}$)
Pectine-N	-2,5 +/- 0,2
Pectine-F	-1,9 +/- 0,1
Chitosane-N	3,3 +/- 0,2
Chitosane-F	1,4 +/- 0,1

La charge de surface des polymères a été déterminée par mesure de la mobilité électrophorétique (Tableau 11). Une diminution de la charge positive du chitosane de 3,3 +/- 0,2 à 1,4 +/- 0,1 mV et de la charge négative de la pectine de -2,5 +/- 0,2 à -1,9 +/- 0,1 mV sont remarquées. Elles sont dues aux produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur les groupements chargés des polymères. Le greffage enzymatique d'un composé phénolique tel que les produits d'oxydation de l'acide férulique à un polymère tel que la pectine et / ou le chitosane, modifie leur charge (Aljawish et al., 2012).

La distribution de taille des polymères est caractérisée par trois valeurs : D_{10} , D_{90} , D_{50} (Tableau 12). D_{50} représente la taille moyenne des particules. D_{10} et D_{90} représentent respectivement 10 % et 90 % de la population des particules et représentent respectivement les tailles des particules les plus petites et les plus grandes. Alors, le span qui représente la largeur de la distribution, est défini comme étant le rapport de l'intervalle de diamètre des particules entre le

D₁₀ et D₉₀ sur le D₅₀. Plus le span est petit ($\text{span} \leq 1$), plus la population des particules est dite monodisperse avec une largeur du pic de base étroite.

Tableau 12 : Distribution granulométrique de la pectine et du chitosane sous forme native (N) et fonctionnalisée (F) à une concentration de 0,15 % et un pH de 4,5

Biopolymères	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)	Span = $\frac{D_{90}-D_{10}}{D_{50}}$
Pectine-N	5 ± 1	18 ± 1	40 ± 4	1,94
Pectine-F	2 ± 0	9 ± 1	53 ± 40	5,60
Chitosane-N	4 ± 1	51 ± 12	228 ± 36	4,39
Chitosane-F	7 ± 1	40 ± 28	408 ± 303	10,03

Le Span de la pectine-N est égal à 1,94 alors que celui de pectine-F est égal à 5,6. La même tendance est remarquée pour le chitosane natif et fonctionnalisé. Les polymères fonctionnalisés présentent donc un span plus grand que celui mesuré les polymères natifs donc une distribution plus large. La présence de plusieurs populations de microparticules présentant des tailles différentes rend l'analyse des données difficiles. Par conséquent, il est difficile d'établir une corrélation entre la présence de composés phénoliques et la taille des polymères. D'après d'autres travaux, des particules fonctionnalisées présentent une distribution de taille plus large (Pelaz et al., 2015).

IV.1.3 Mise au point des auto-assemblages des biopolymères

Plusieurs paramètres interviennent dans la préparation des microparticules : la température, le pH, le temps de la réaction, la concentration en polysaccharides, le ratio entre les polymères, la concentration en acide acétique utilisé pour solubiliser le chitosane... Ainsi, il est important de choisir des conditions permettant d'obtenir des microparticules présentant une distribution de taille la plus étroite possible et avec, dans la mesure du possible, une taille majoritaire comprise entre 100 et 300 µm. De plus, nous avons choisi de préparer des microparticules présentant une charge de surface neutre reflétant ainsi un maximum d'interaction entre les polymères (Müller, 2014).

Selon cette approche, quatre assemblages ont été préparés pour former des microparticules pour évaluer l'impact de la fonctionnalisation des polymères sur l'auto-assemblage, notamment sur le ratio entre les polymères (pour obtenir une charge de surface nulle) et sur la distribution de taille obtenue. Les quatre combinaisons d'assemblage préparées sont :

- Pectine native-chitosane natif
- Pectine native-chitosane fonctionnalisé
- Pectine fonctionnalisée-chitosane natif
- Pectine fonctionnalisée-chitosane fonctionnalisé

Après avoir préparé les microparticules par auto-assemblage entre les polymères natifs et/ou fonctionnalisés, une mesure de la taille est menée sur un appareil de diffusion statique de la lumière (voie humide) (Cf chapitre matériels et méthodes).

IV.1.4 Influence des conditions de préparation sur la distribution de taille des microparticules de pectine native/ chitosane natif

Afin d'étudier l'effet des conditions de préparation sur les caractéristiques finales (taille et charge) des microparticules, une approche faisant varier une condition à la fois a été menée.

IV.1.4.1 Influence de la concentration en acide acétique sur la taille des microparticules

Afin d'étudier l'effet de la concentration en acide acétique sur la taille des particules de pectine native-chitosane natif, trois concentrations ont été testées. Les résultats sont exprimés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Variation de la taille des microparticules de pectine native-chitosane natif en fonction de la concentration en acide acétique

Concentration en acide acétique (v/v) %	Span	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
1	1,55	242 +/- 25	630 +/- 91	1220 +/- 287
0,1	1,89	70 +/- 03	228 +/- 16	502 +/- 44
0,06	1,52	35 +/- 02	77 +/- 08	152 +/- 23

D'après les résultats, l'augmentation de la concentration en acide acétique (de 0,06 à 1 % v/v), entraîne une augmentation de la taille moyenne des microparticules de 77 à 630 µm tout en gardant un span relativement constant (environ 1,5). L'analyse de ces résultats suggère qu'une faible concentration en acide acétique entraîne une force ionique du milieu faible. La concentration faible en charge négative (acétate) pouvant masquer les charges du chitosane permet un auto-assemblage avec la pectine rapide donnant ainsi des particules de petite taille. Cependant, une trop faible concentration en acide acétique ne permet pas une solubilisation optimale du chitosane. Des auteurs suggèrent qu'une concentration en acide acétique égale à 1,5 fois celle du chitosane est suffisante si le polymère est de faible masse molaire (Fan, Yan, Xu, & Ni, 2012). De plus, il semblerait que la masse molaire du chitosane choisie (grande, moyenne, petite) avait une influence non négligeable sur la taille des particules formées (Omar Zaki et al., 2015). D'après ces résultats, la meilleure concentration en acide acétique parmi les trois testées est celle à 0,06 % v/v. En effet, cette dernière permet d'obtenir la distribution la plus étroite et une valeur de span faible.

IV.1.4.2 Influence de la température sur la taille des microparticules

Pour tester l'influence de la température sur la taille des microparticules obtenues, trois températures ont été choisies : 4, 25 et 70 °C. Le choix de ces températures revient au fait que :

- 4 °C est la température de conservation des microparticules et celle généralement utilisée pour conserver des produits en froid positif

- 25 °C est la température moyenne utilisée dans les approches thermodynamiques
- 70 °C est une température relativement élevée qui permet d'augmenter la flexibilité des chaînes de polymères en raison de la réduction de leurs viscosités intrinsèques (Muhidinov et al., 2010).

Les résultats sont présentés dans la Figure 35.

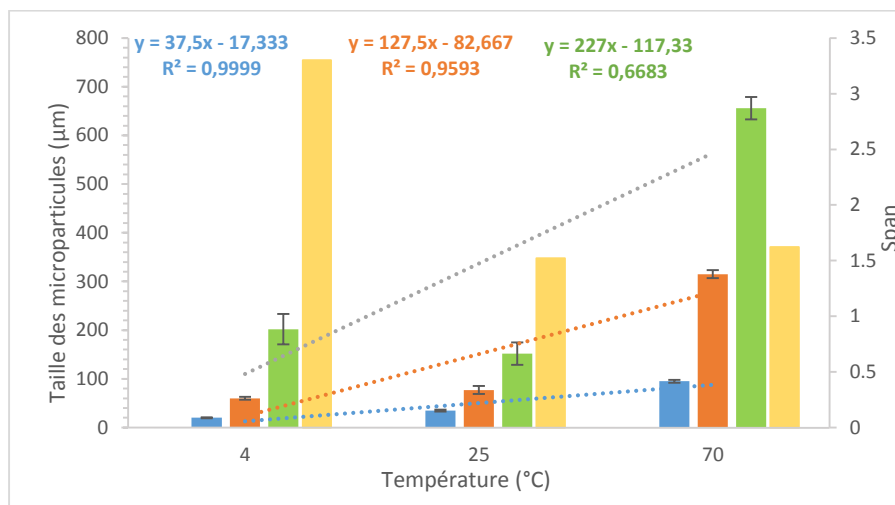


Figure 35 : Variation de la distribution de taille des microparticules de pectine native /chitosane natif. D₁₀ en bleu, D₅₀ en rouge, D₉₀ en vert et le span en jaune, en fonction de la température

Lorsque l'auto-assemblage est réalisé à 4 °C, la taille moyenne des microparticules (D₅₀) obtenue est de 60 μm cependant il y a deux populations de microparticules expliquant la valeur de span élevée (3,27). A 25 °C la valeur de D₅₀ est de 77 μm et celle du span de 1,52. Enfin à 70 °C, la valeur de D₅₀ est significativement plus grande (de l'ordre de 315 μm) avec une valeur de span relativement faible, de l'ordre de 1,78.

L'analyse de ces données montre que l'augmentation de la température du milieu réactionnel aboutit à une augmentation de la taille des microparticules. Cependant, seule la température de 25 °C permet d'obtenir une population de microparticules relativement étroite. Ce résultat est en accord avec la littérature, où des auteurs ont trouvé que des températures faibles ou élevées

produisent de grandes microsphères formées à partir de polycaprolactone et de (DL-acide polylactique-co-glycolique) et contenant de l'albumine de sérum bovin tandis que les températures intermédiaires produisent des microsphères plus petites (Yang, Chung, Bai, & Chan, 2000). Cependant, Fan et al., (2012), en travaillant sur le chitosane seul par la technique de gélification ionique, ont montré que l'augmentation de la température réduit la taille des nanoparticules formées, l'explication avancée est que la viscosité interne du chitosane est réduite dans ces conditions.

D'après les résultats obtenus la concentration en acide acétique doit être fixée à 0,06 % et la température doit être maintenue à 25 °C pour étudier l'influence des autres paramètres.

IV.1.4.3 Influence de la vitesse d'agitation sur la taille des microparticules

L'influence de la vitesse d'agitation sur la taille des particules formées par auto-assemblage entre la pectine native et chitosane natif est présentée dans la Figure 36.

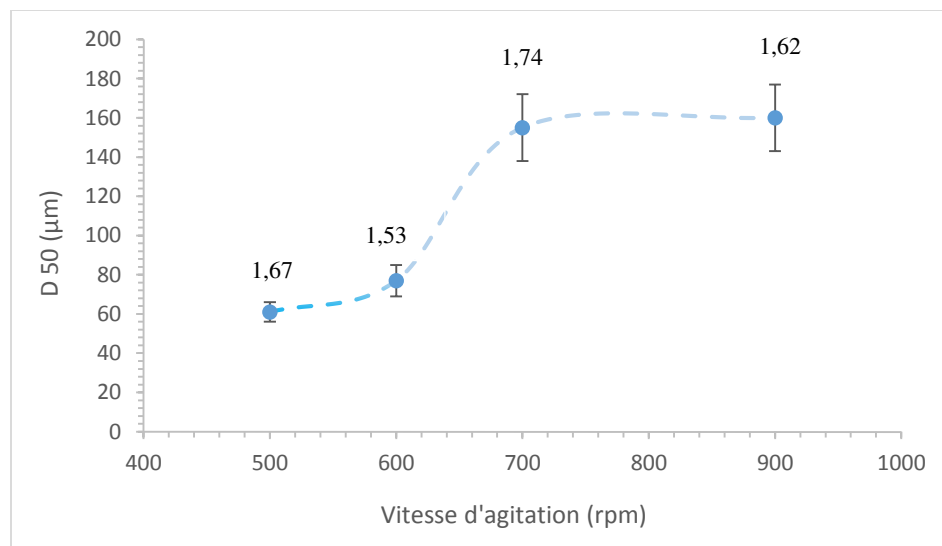


Figure 36 : Variation de la taille moyenne (D₅₀) des microparticules pectine native / chitosane natif en fonction de la vitesse d'agitation (rpm). La valeur de span obtenue pour chaque condition est notée au-dessus de chaque point

L'analyse des résultats montre que la taille moyenne des microparticules formées augmente (de 61 à 155 μm) avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de 500 à 900 rpm tout en gardant une valeur de span relativement constante, comprise entre 1,53 et 1,74. Dans ces conditions, les distributions de taille des microparticules peuvent être qualifiées de monodisperses.

Une vitesse d'agitation élevée induit une augmentation de la taille des microparticules. Ce résultat est en accord avec celui d'autres auteurs qui ont travaillé sur des microsphères formés à partir de n-butyl methacrylate et de *N*-methyolacrylamide (Hong, 2008). Cependant, d'autres auteurs ont décrit un effet inverse, la taille moyenne des particules de chitosane est réduite avec l'augmentation de la vitesse (Fan et al., 2012). Il est important de noter que dans cette étude, les vitesses d'agitation étaient plus faibles (100, 300 et 600 rpm) que celles généralement utilisées et que la durée de réaction était longue (48 h), ce qui pouvait entraîner une dégradation des particules. L'augmentation de la force de cisaillement permet de diminuer la largeur de la distribution de taille (diminution de la valeur du span). Cependant, un cisaillement trop intense peut changer la structure des polymères pouvant favoriser les interactions entre eux ce qui se traduit par une distribution de taille de particules plus large (augmentation de la valeur de span) (Fan et al., 2012).

Dans nos conditions, une vitesse d'agitation de 600 rpm permet d'obtenir une distribution de taille étroite et une taille maximale inférieure à 300 μm .

IV.1.4.4 Influence du temps réactionnel sur la taille des microparticules

L'influence du temps réactionnel est étudiée sur l'assemblage pectine native-chitosane natif avec un ratio 1/1. Pour cela, la taille des microparticules pectine native/chitosane natif est étudiée en fonction de différentes valeurs de temps réactionnel (10, 30, 60 min) et les résultats sont montrés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Variation de la taille des microparticules pectine native/chitosane natif (ratio 1:1) en fonction du temps réactionnel

Temps réactionnel (min)	Span	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
10	1,70	05 +/- 01	10 +/- 01	22 +/- 01
30	2,38	06 +/- 01	13 +/- 01	37 +/- 04
60	1,54	13 +/- 01	28 +/- 02	56 +/- 05

A un ratio volumique de pectine/chitosane de 1 :1, les microparticules formées au bout de 10 et 30 min ne présentent pas de différence significative ni au niveau de leur taille moyenne (D₅₀) ni au niveau de la taille de la population minoritaire (D₉₀). Cependant, les valeurs de D₉₀ sont significativement différentes : à 30 min la distribution de taille est plus large ce qui se traduit par une valeur de span plus élevée. La taille plus petite des microparticules obtenues est due au ratio utilisé qui est différent de celui des autres expériences (Cf chapitre matériels et méthodes Tableau 6). Un temps d'agitation plus long semble donc favoriser l'agrégation des polysaccharides étudiés. Cette observation est confirmée au bout de 60 min d'agitation. En effet, toutes les valeurs ont significativement augmenté mais d'une manière surprenante la distribution de taille est plus fine. Les polymères ont besoin d'une certaine durée de contact entre eux pour former des microparticules de taille uniforme et pour que le système soit à l'équilibre thermodynamique. D'après ces expériences, le temps réactionnel de 60 min permet d'obtenir dans nos conditions la valeur de span la plus faible.

IV.1.4.5 Influence de la concentration des polysaccharides sur la taille des microparticules

L'influence de la concentration des polysaccharides est étudiée sur l'assemblage pectine native/chitosane natif (Cf chapitre matériels et méthodes Tableau 6). Différentes concentrations de polymères sont testées 0,05 ; 0,1 ; 0,125 ; 0,15 et 0,25 % (m/v) et les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Variation de la distribution de taille des microparticules de pectine native/chitosane natif en fonction de la concentration de polysaccharides

Concentration des polysaccharides % (m/v)	Span	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
0,05	1,52	35 +/- 02	77 +/- 08	152 +/- 23
0,125	2,48	51 +/- 04	174 +/- 15	482 +/- 53
0,15	3,09	85 +/- 16	464 +/- 78	1520 +/- 235
0.25	1,99	286 +/- 15	958 +/- 62	2190 +/- 117

L'augmentation de la concentration mise en œuvre de 0,05 à 0,25 % (m/v) aboutit à une augmentation de la taille des microparticules formées allant de 77 +/- 08 µm à 958 +/- 62 µm. Ainsi, il semblerait que plus la concentration totale en polymères est importante, plus la taille des particules formées est grande. Ceci a été aussi rapporté dans la littérature par Srivastava et al., (2005) qui ont préparé des microparticules à base de hydroxypropylméthyl cellulose et d'éthyle cellulose. Ce phénomène peut être probablement corrélé à une cinétique de deuxième ordre dans laquelle la concentration joue un rôle prépondérant dans la vitesse d'auto-assemblage. Lorsque la concentration en polymères augmente, les interactions entre les chaînes de charges opposées augmentent conduisant à un rapprochement plus rapide des molécules et à la formation de particules de plus grande taille. Concernant, les valeurs de span, la distribution de taille des particules formées semble moins large pour les faibles et pour les grandes concentrations en polymères. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations, les probabilités d'interactions entre les polymères sont plus faibles ce qui se traduit par de petits objets homogènes en taille. Aux concentrations importantes de gros objets apparaissent : la matière s'auto-assemble vite et le système atteint plus rapidement l'équilibre thermodynamique, la distribution de taille est plus fine. Aux concentrations intermédiaires, la matière peut s'organiser de façon plus aléatoire.

Dans les conditions étudiées, la concentration en polymères retenue est celle à 0.05 % (m/v) car les particules ainsi formées sont de petite taille tout en ayant une distribution relativement fine.

IV.1.4.6 Influence du ratio en polymères sur la taille des microparticules

Le ratio en polymères est un des paramètres qui joue un rôle dans leur auto-assemblage. Afin d'étudier l'influence du ratio en polymères sur la taille des particules formées, plusieurs ratios pectine:chitosane ont été testés allant de 1:1 à 3:1 (Cf Tableau 6 du chapitre Matériels et Méthodes). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 37.

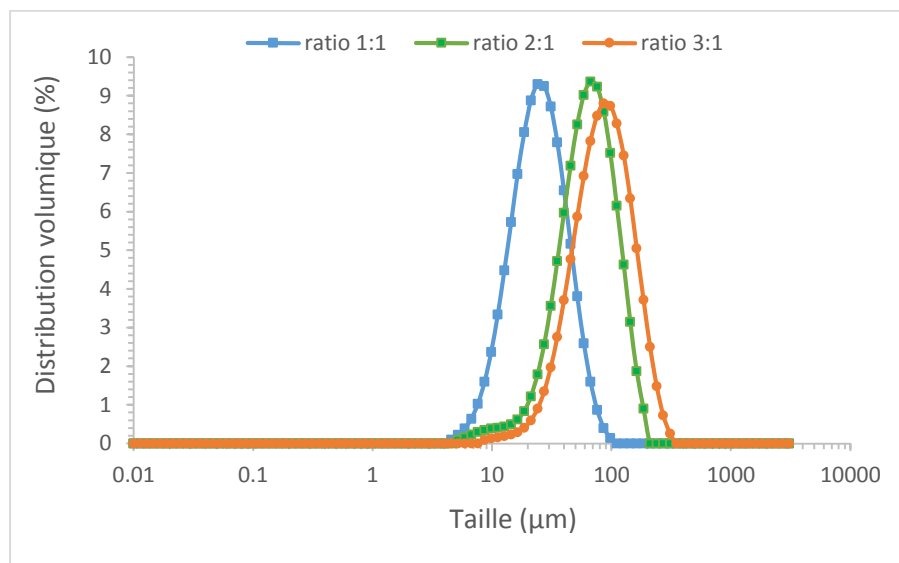


Figure 37 : Variation de la distribution de taille des microparticules de pectine native/chitosane natif en fonction du ratio entre les polysaccharides. Déviation standard < 5 %

L'analyse des résultats suggère qu'une proportion de pectine plus importante dans le mélange favorise l'augmentation de la taille des particules. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de span entre les trois assemblages ce qui signifie que les distributions de taille sont presque identiques. Par contre la taille moyenne des particules (D_{50}) passe de 28 μm à 104 μm en passant par 77 μm lorsque le ratio augmente respectivement de 1:1 à 3:1 en passant par 2:1 (Tableau 16). La taille des particules dépend du ratio en polysaccharides utilisés, ce phénomène a été également décrit par Picone & Cunha (2013) qui ont préparé des nanoparticules de chitosane/gellane.

Tableau 16 : Variation des paramètres de taille (D_{10} , D_{50} et D_{90}) en fonction du ratio volumique de pectine native : chitosane native

Ratio pectine : chitosane	1 : 1	2 : 1	3 : 1
D_{10}	13 +/- 01	35 +/- 02	47 +/- 05
D_{50}	28 +/- 02	77 +/- 08	104 +/- 12
D_{90}	56 +/- 5	152 +/- 23	208 +/- 28
Span	1,54	1,52	1,55

IV.1.5 Influence de la fonctionnalisation sur la distribution de taille

Quatre assemblages ont été préparés (Figure 38) dans les conditions mises en œuvre ci-dessus à savoir : une concentration de chaque polymère de 0,05 % (m/v) et une concentration en acide acétique pour solubiliser le chitosane de 0,06 %. Le ratio pectine :chitsoane retenu est (2 :1). L'auto-assemblage a été réalisé à une vitesse d'agitation de 600 rpm, pendant une heure et à une température de 25 °C.

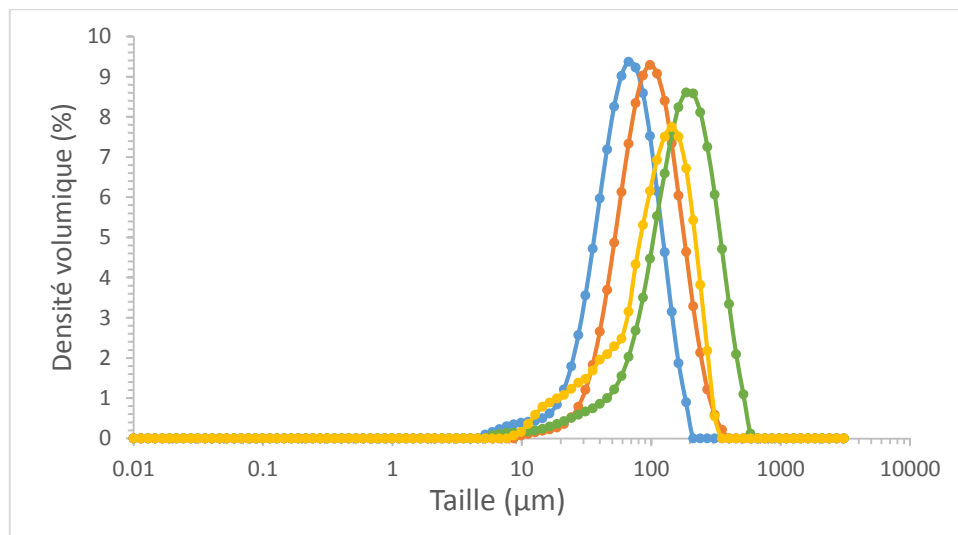


Figure 38 : Distribution de taille des microparticules de pectine native:chitosane natif (bleu), de pectine native:chitosane fonctionnalisé (vert), de pectine fonctionnalisée:chitosane natif (orange) et de pectine fonctionnalisée:chitosane fonctionnalisé (jaune) à 0,05 %, dans le milieu réactionnel à pH 4,5 et à 25 °C

Les résultats de distribution de taille obtenus sont résumés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Distribution de taille des microparticules en fonction des assemblages de pectine:chitosane formés

	D₁₀ (µm)	D₅₀ (µm)	D₉₀ (µm)	Span
Pectine N/chitosane N	35 +/- 02	77 +/- 08	152 +/-23	1,52
Pectine N/chitosane F	62 +/- 03	165 +/- 08	326 +/- 15	1,59
Pectine F/chitosane N	75 +/- 06	137 +/-19	232 +/- 46	1,10
Pectine F/chitosane F	27 +/- 02	97 +/- 09	193 +/- 15	1,71

N : natif et F : fonctionnalisé

Toutes les microparticules préparées ont une taille moyenne de l'ordre de 100 micromètres avec des valeurs de span proche de 1 ce qui reflète des distributions de taille relativement étroites. Cependant, la taille moyenne des microparticules formées de polymères natifs ($D_{50} = 77 \pm 08 \mu\text{m}$) est inférieure à celle formée avec des polymères fonctionnalisés ($97 \pm 09 \mu\text{m}$). La fonctionnalisation semble augmenter la taille des particules obtenues. Ceci est probablement dû à des interactions entre les composés phénoliques présents sur les polymères. D'autre part, lorsque les microparticules sont formées à partir d'un polymère natif et d'un autre fonctionnalisé, la taille moyenne des particules formées semble plus grande que celle obtenue avec uniquement des polymères natifs ou uniquement des polymères fonctionnalisés. Il semblerait donc que la présence de composés phénoliques sur un des deux polymères suffit à augmenter la taille des particules. Il est cependant difficile à l'heure actuelle d'aller plus loin sans connaître la structure adoptée par les polymères dans ces particules mixtes.

IV.1.6 Préparation des microparticules neutres

En effet, un maximum d'interaction entre deux polyélectrolytes de charges opposés est assuré lorsque l'auto-assemblage est neutre. D'où l'importance de déterminer un ratio volumique de pectine : chitosane assurant cette neutralité. Le tableau 18 montre les ratios utilisés pour avoir des

microparticules neutres. D'après les résultats de ce tableau, la charge des microparticules est trouvée dépendante du ratio du polysaccharide. Ceci est en accord avec les résultats de Picone & Cunha, (2013) qui ont trouvé que le ratio du chitosane: gomme gellane a nettement affecté la distribution des tailles de particules.

Tableau 18 : Les ratios volumique pectine : chitosane des quatre assemblages préparés à partir des polymères natifs et fonctionnalisés et leur potentiel Zeta

Assemblages	Ratio pectine:chitosane	Potentiel Zeta des assemblages (mV)
Pectine N - chitosane N	2 : 1	0,25 +/- 0,08
Pectine N - chitosane F	1 : 1	0,22 +/- 0,01
Pectine F - chitosane N	6 : 1	0,95 +/- 0,28
Pectine F - chitosane F	2 : 1	0,10 +/- 0,06

IV.2 Encapsulation

Afin de vérifier l'influence de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine et du chitosane sur l'aptitude des assemblages à fixer un composé hydrophobe, une étude a été menée sur ces deux polymères fonctionnalisés pour déterminer leur efficacité d'encapsulation de la curcumine vis-à-vis des polymères natifs.

IV.2.1 Encapsulation de la curcumine

En appliquant le protocole détaillé dans le chapitre assemblage et encapsulation de la partie matériels et méthodes, des microparticules ont été formées en présence de la curcumine (molécule hydrophobe modèle) pour la piéger au sein de la structure des particules. Grâce à cette approche, l'influence des composés phénoliques (présents sur les polysaccharides) sur le taux d'encapsulation de la curcumine pourra être déterminée.

L'absorbance de la curcumine libre est mesurée à 425nm. La valeur d'absorbance du témoin correspondant à aucune encapsulation de la curcumine est de 0,2 correspondant à la concentration maximale de 1,606 µg/ml soit 20,88 µg dans notre étude (13 ml lors de l'auto-assemblage).

L'étape suivante est la vérification du taux d'encapsulation en dosant la curcumine libre dans le surnagent (qui représente la curcumine non piégée dans les microparticules) ainsi que la curcumine dans le culot (qui représente la curcumine piégée dans les microparticules) afin de dresser un bilan massique.

IV.2.2 Dosage du curcumine dans le surnagent

Les résultats du dosage spectrophotométrique de la curcumine libre dans le surnagent sont montrés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Pourcentage de la curcumine piégée dans les quatre types de microparticules

Surnagent	curcumine en $\mu\text{g/ml}$	% curcumine piégée
pectine N/chitosane N	$0,40 \pm 0,02$	75 ± 1
Pectine N/chitosane F	$0,57 \pm 0,01$	64 ± 1
Pectine F/chitosane N	$1,06 \pm 0,01$	34 ± 1
Pectine F/chitosane F	$1,17 \pm 0,03$	27 ± 1

F : fonctionnalisé et N : natif. Moyenne et écarts-types sur 3 dosages indépendants

Le pourcentage de la curcumine libre dans le surnagent est calculé de la façon suivante :
l'équation de la droite de calibration de la curcumine : $y = 0,1245.x$

L'absorbance qui correspond à 100 % de curcumine libre est de 0,2 ce qui correspond à 1,606 $\mu\text{g/mL}$, équivalent à 20,88 μg de curcumine présent dans 13 mL de polymères.

L'absorbance de la curcumine libre dans le surnagent après auto-assemblage pectine native/chitosane native est de 0,05 la concentration de la curcumine libre est égale à $0,05 / 0,1245 = 0,40 \mu\text{g} / \text{mL}$. Le volume de l'aliquot est de 2 mL, ainsi la masse de curcumine totale est de 0,80 μg . Le pourcentage de la curcumine libre dans le milieu est calculé selon l'équation suivante :

$$\frac{\text{Masse de la curcumine libre dans 2 mL}}{\text{Masse de la curcumine initiale}} * 100$$

$$\text{Le pourcentage de la curcumine libre} = \frac{0,80}{3,212} * 100 = 24,9 \% \text{ (arrondi à } 25 \% \text{)}.$$

Par suite, le pourcentage de la curcumine piégée est égal à $100 - 25 = 75 \%$.

L'analyse des résultats montre que le pourcentage de curcumine encapsulée dans les microparticules est très variable. Ce sont les microparticules formées à partir des polymères non fonctionnalisés qui présentent le meilleur taux d'encapsulation (de l'ordre de 75 %). Ce taux diminue de 11 % si la microparticule contient du chitosane fonctionnalisé avec des composés phénoliques. Enfin, le taux d'encapsulation (de l'ordre de 30 %) de la curcumine chute drastiquement si les microparticules ont été formées avec de la pectine fonctionnalisée. Ainsi, il s'avère que la présence de composés phénoliques greffés sur les polysaccharides n'améliore pas le taux d'encapsulation d'un composé hydrophobe. De plus, la fonctionnalisation fait diminuer de façon importante le taux d'encapsulation. Par conséquent, la curcumine n'interagit pas à priori avec les composés phénoliques greffés. L'encapsulation plus efficace avec les polymères natifs peut s'expliquer en partie par les interactions entre la curcumine et les polysaccharides par π - π stacking notamment avec le chitosane (Amirthalingam, Kasinathan, Mutalik, & Udupa, 2015). Beaucoup d'étude se sont focalisées sur la formation de nanoparticules de chitosane pour encapsuler la curcumine (Liu, Cai, Jiang, Wu, & Le, 2016; Mazzarino et al., 2015; Mitra, 2008; Saikia, Boruah, Kakoty, & Hazarika, 2014). Dans notre approche, les résultats suggèrent que la pectine joue un rôle important dans le phénomène d'encapsulation de la curcumine. En effet, si la pectine est modifiée, le taux d'encapsulation diminue fortement. Une étude récente portant sur l'encapsulation de la curcumine dans un complexe zéine/pectine LM a montré de très bon taux d'encapsulation (84 %) et c'est notamment grâce à la présence de la pectine (Hu et al., 2015). Il serait tout de même intéressant de mesurer l'efficacité de l'encapsulation d'une molécule hydrophile avec des microparticules formées à partir de chitosane et de pectine pouvant être ou non modifiés avec des composés phénoliques. Enfin, malgré les faibles taux d'encapsulation, il est intéressant de vérifier la facilité de récupération du composé d'intérêt présent dans les microparticules.

IV.2.3 Récupération de la curcumine dans les microparticules

La quantité de curcumine récupérée à partir des microparticules, suggère que malgré un faible taux d'encapsulation pour les microparticules formées avec de la pectine fonctionnalisée, le taux de libération est bon voire meilleur que celui obtenu avec les polymères natifs (Tableau 20). En effet, malgré 75 % (soit 15,7 µg de curcumine) d'encapsulation pour les polymères natifs, seulement 32 % (soit 5,0 µg de curcumine) peuvent être récupérés alors que les microparticules préparées avec les polymères fonctionnalisés permettent de récupérer 53 % (soit 3,0 µg de curcumine) de la curcumine piégée à un taux d'encapsulation de 27 % (soit 5,6 µg de curcumine). Ainsi avec les polysaccharides fonctionnalisés les pertes en composé d'intérêt sont moins importantes.

Tableau 20 : Pourcentage de la curcumine piégée dans les quatre types de microparticules

Microparticules	Concentration en µg/ml	Pourcentage de libération
pectine N/chitosane N	5,01 ± 0,03	32 ± 1
Pectine N/chitosane F	2,62 ± 0,02	20 ± 1
Pectine F/chitosane N	3,18 ± 0,02	45 ± 1
Pectine F/chitosane F	3,01 ± 0,01	53 ± 1

F : fonctionnalisé et N : natif. Moyenne et écarts-types sur 3 dosages indépendants

IV.3 Conclusion

Ce dernier chapitre de la thèse est divisé en deux sous-parties. La première partie portait sur l'étude de l'auto-assemblage de polysaccharides : la pectine LM et le chitosane pour former des microparticules par formation d'un complexe polyélectrolytes (PEC).

Dans un premier temps, l'influence de plusieurs paramètres physicochimiques sur la taille des microparticules et la distribution de taille a été étudiée. Le but de cette partie était de trouver les conditions pour former des particules d'une taille inférieure à 300 µm et avec une distribution

de taille la plus fine possible. Ces premiers essais permettront par la suite de réaliser un plan d'expériences pour optimiser ces conditions.

La deuxième partie était consacrée à l'étude de l'influence de la présence de composés phénoliques sur la capacité des microparticules pectine/chitosane à encapsuler un composé phénolique hydrophobe modèle : la curcumine. Les résultats obtenus ont montré que la présence de la fonctionnalisation diminue drastiquement le taux d'encapsulation. Cependant, les résultats obtenus ont permis de montrer un intérêt à modifier les polysaccharides avec cette stratégie. En effet, la curcumine est libérée plus facilement lorsque cette dernière est encapsulée dans les microparticules formées de polymères modifiés.

Conclusions et Perspectives

IV. Conclusion et Perspectives

Ce travail est divisé en trois grandes parties, sachant que l'objectif initial de ce travail était de vérifier la faisabilité d'un greffage covalent par voie enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine faiblement méthylée (LM), puis d'étudier la relation entre la structure et les propriétés de cette nouvelle pectine fonctionnalisée (pectine-F). Compte-tenu des substrats mis en œuvre, des fonctionnalités intéressantes devaient être mises en évidence. Ce greffage a été catalysé par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (E.C.1.10.3.2) en milieu aqueux (tampon phosphate) et dans des conditions expérimentales douces (30 °C et pH 7,5). Cette méthodologie s'intègre donc tout-à-fait dans une optique de développement durable.

Rappelons que cette stratégie repose sur des travaux antérieurs menés au sein du laboratoire constituant ainsi une expertise sur l'oxydation enzymatique de l'acide férulique en milieu aqueux et à pH 7,5 par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (Mustafa, Muniglia, Rovel, & Girardin, 2005). Ces travaux ont permis de caractériser les produits d'oxydation de l'acide férulique. De plus, cette expertise a permis de maîtriser la fonctionnalisation enzymatique du chitosane par cet acide phénolique et son ester (férulate d'éthyle) (Aljawish et al., 2012, 2014a).

Aujourd'hui, l'analyse de la littérature montre qu'aucune étude ne porte sur la fonctionnalisation enzymatique de la pectine avec des composés phénoliques exogènes, i.e. non présents naturellement dans la structure du polysaccharide comme c'est le cas pour la pectine de betterave à sucre.

D'un point de vue cinétique, ce travail a mis en évidence que la pectine influençait la vitesse d'oxydation de l'acide férulique. La comparaison de la vitesse de consommation du substrat phénolique en absence et en présence de pectine suggère que ce polysaccharide ralentit la vitesse d'oxydation de l'acide férulique par l'enzyme. Toutefois, il semblerait que la présence de pectine

protège l'enzyme vis-à-vis de l'inhibition par les radicaux libres générés dans le milieu réactionnel. En réagissant avec les acides aminés constitutifs de la protéine enzymatique, ces derniers contribuent en effet à réduire l'activité catalytique. En réagissant avec la pectine, les radicaux ont moins d'effet sur l'enzyme. De plus, cette oxydation enzymatique a produit une pectine colorée en jaune orangée par les produits d'oxydation de l'acide férulique. Cette couleur persiste après diverses procédures de lavage, ce qui suggère que les produits d'oxydation sont greffés sur le polymère par des liaisons fortes. Le dosage des phénols a montré une plus grande quantité de composés phénoliques sur la pectine fonctionnalisée par rapport la pectine native.

La fonctionnalisation enzymatique de la pectine avec les phénols a entraîné une diminution de la mobilité électrophorétique de la pectine modifiée (pectine-F). Ce résultat pouvait s'expliquer par la disparition de charges négatives portées par les groupements carboxyles de la pectine probablement en raison de l'addition de groupes phénoliques sur ces fonctions. D'après ce résultat, il s'avérait que le greffage du produit d'oxydation de l'acide férulique ciblait la pectine probablement au niveau de l'acide carboxylique. Pour confirmer ou affirmer cette hypothèse, plusieurs vérifications structurales ont été entreprises.

Les analyses structurales (UV-Vis, FTIR, LC-MS) ont révélé une modification claire de la structure de la pectine fonctionnalisée par rapport à la pectine native. L'absorbance élevée observée entre 300 et 350 nm est un indicateur du greffage des produits d'oxydation sur la pectine. L'analyse FTIR de la pectine fonctionnalisée a montré de nouveaux pics dans la région 900-1000 cm^{-1} relative aux groupements aromatiques des produits d'oxydation de l'acide férulique. L'analyse LC-MS a montré que le greffage implique les groupements carboxyliques des acides galacturoniques constituant la chaîne principale de la pectine. Un nouveau produit avec une masse moléculaire de 629 g/mol contenant un dimère d'acide férulique a aussi été mis en évidence.

L'impact de la fonctionnalisation de la pectine sur ses propriétés a été étudié. Il a été montré que la pectine fonctionnalisée présentait, malgré la morphologie de la surface des particules altérées, de meilleures propriétés antioxydantes que celles du polymère natif. Les résultats des isothermes de sorption obtenus ont permis de montrer que la pectine modifiée avait une structure plus contrainte lui conférant un caractère moins hygroscopique que la pectine native à des activités de l'eau inférieure à 0,45 et une structure plus ouverte à des valeurs d' a_w élevées permettant d'absorber des quantités plus importantes d'eau. Ces résultats sont cohérents avec les données issues des analyses thermiques suggérant une structure moins organisée et moins compacte pour la pectine fonctionnalisée par rapport au polymère natif. D'un point de vue rhéologique, un paramètre important pour un texturant/gélifiant, il s'avérait que la pectine était toujours un fluide non-Newtonien rhéofluidifiant mais que sa viscosité et sa vitesse de gélification ont diminué significativement en comparaison avec la pectine native.

Notre premier objectif était de s'assurer de la faisabilité d'un greffage covalent des produits d'oxydation de l'acide férulique sur la pectine. Cet objectif est atteint grâce au développement d'une méthode « verte » pour la synthèse d'une néo-pectine présentant des propriétés intéressantes comme une couleur orangée, une activité antioxydante et une réduction du caractère hydrophile, responsable du problème d'agglomération lors de la solubilisation dans l'eau et l'amélioration de son stockage. Par conséquent, cette pectine-F pourrait trouver des applications dans les industries alimentaires en tant qu'ingrédient à multiple fonctionnalité comme texturant, colorant, antioxydant.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des relations pouvant exister entre la structure de la pectine et ses propriétés fonctionnelles, une deuxième méthode de modification de la pectine avec les produits d'oxydation de l'acide férulique a été envisagée. Cette méthode consiste à générer des produits d'oxydation (POX) de l'acide férulique dans une étape préalable. Une fois formés, ces produits d'oxydation sont additionnés à la pectine pour permettre leur adsorption sur le

polysaccharide. Cette dernière est par la suite nommée pectine-POX. Une comparaison a été ensuite menée entre la pectine-POX et la pectine native d'une part et entre les pectines modifiées (-F et -POX) d'autre part.

Les analyses structurales et biochimiques ont montré une incorporation plus importante de composés phénoliques dans le cas de la pectine-F par rapport à la pectine-POX. La microscopie électronique à balayage des poudres de pectine a révélé différentes morphologie de surface : la pectine native présente une surface rugueuse tandis que la pectine-POX est caractérisée par une surface squameuse et la pectine-F par une surface lisse. Ainsi, des changements morphologiques dus à la fonctionnalisation ont été clairement mis en évidence. Ceux-ci sont attribués à l'incorporation de composés phénoliques dans la structure du polymère.

En outre, la caractérisation physicochimique de la pectine et de ses dérivés (rhéologie, couleur, propriétés thermiques et antioxydantes) a montré que les propriétés des polymères sont influencées non seulement par le taux d'incorporation de composés phénoliques mais également par le mode de liaison de ces composés à la pectine (liaison covalente ou par adsorption).

La pectine native et ses formes dérivées ont un profil rhéofluidifiant. Une viscosité plus importante a été observée pour les pectines native et POX comparativement à la pectine F. Ce phénomène est lié aux phénols greffés qui viennent s'insérer entre les chaînes de pectine et diminuent les interactions inter-chaîne. Un comportement viscoélastique a été démontré pour tous les types de pectine (native et modifiées). Toutefois, la fonctionnalisation de la pectine influence sa cinétique de gélification. La vitesse de gélification de la pectine suite à l'ajout de calcium est instantanée pour la pectine native. La pectine-POX gélifie ensuite, suivie par la pectine-F qui gélifie en dernier.

D'autre part, les analyses thermiques ont montré que les deux méthodes de greffage des phénols, par liaison covalente et par adsorption, désorganisent la structure de la pectine en

conduisant à un réseau plus instable et moins compact, caractérisé par des températures de transition diminuées par rapport à celles du polymère natif.

Le caractère hygroscopique des polymères est aussi influencé par la méthode de greffage des phénols sur la pectine. La gravimétrie d'adsorption de la vapeur d'eau a montré que plus la teneur en phénols est importante dans la pectine, plus le caractère hydrophobe est important et moins le polymère est hygroscopique. Par conséquent, à une activité d'eau (a_w) de moins de 0,45, la pectine-POX est moins hygroscopique que la pectine-F qui elle-même est moins hygroscopique que la pectine native. La pectine native nécessite un stockage dans des conteneurs scellés, dans un environnement à humidité inférieure à 50 %. Les pectines modifiées seront moins sensibles à la reprise d'humidité au cours du stockage. A des a_w supérieurs à 0,5, les pectines modifiées présentent la particularité d'absorber l'eau plus facilement que la pectine native. Ceci suggère une dispersion et une solubilisation plus aisées.

Quelle que soit la méthode de fonctionnalisation, une étude des propriétés antioxydantes a révélé que les pectines modifiées sont beaucoup plus actives que la pectine native pour piéger les espèces radicalaires. La pectine native présente une très faible activité antioxydante liée à la faible quantité de phénols naturellement présents dans sa structure. Les pectines fonctionnalisées présentent une activité d'autant plus importante que le taux de phénols intégrés est important. Cette nouvelle propriété permet d'envisager l'utilisation de pectines modifiées en tant qu'ingrédients présentant des propriétés texturantes ainsi qu'une fonction antioxydante utilisable surtout dans des applications cosmétique et agroalimentaire.

L'ensemble des conclusions qui précèdent montre que le type de fonctionnalisation appliqué a un impact aussi bien sur la structure que sur les propriétés techno-fonctionnelles et biologiques des pectines. De plus, selon les résultats obtenus, la pectine-POX devrait être utilisable dans des applications plus larges que la pectine-F. En plus, de son utilisation dans l'industrie alimentaire

comme agent texturant et épaississant, grâce à ses propriétés rhéologiques, la pectine-POX peut servir comme un additif antioxydant pour la conservation des aliments, grâce à son activité antioxydante gagnée et comme un colorant alimentaire, remplaçant les colorants synthétiques en raison de sa nouvelle couleur.

Le troisième objectif de cette thèse, était de voir l'influence de la modification de la pectine et du chitosane (fonctionnalisé par Aljawish et al. (2014b)) sur l'assemblage et l'encapsulation de la curcumine. Les résultats ont montré que l'utilisation des polymères sous leurs formes natives ou fonctionnalisées influence les conditions de préparation de microparticules : l'agitation, le ratio volumique et la concentration en polymère et les tailles obtenues. Enfin, concernant l'influence de la fonctionnalisation sur l'encapsulation de la curcumine (molécule hydrophobe modèle), il s'avère que la fonctionnalisation diminue le taux d'encapsulation. Cet inconvénient est contrebalancé par une libération plus efficace de la curcumine dès que les polymères sont fonctionnalisés. Ces résultats suggèrent que la fonctionnalisation des polysaccharides devrait permettre à terme d'économiser du principe actif.

Pour conclure, notre étude a permis de développer un protocole de modification d'une pectine LM de citron par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique, davantage respectueux de l'environnement et en accord avec les principes de la chimie verte. Ce procédé de fonctionnalisation améliore et apporte des propriétés intéressantes à la pectine telles que des propriétés antioxydantes, thermiques, hygroscopiques, visuelles (couleurs)... Ceci permet d'élargir son champ d'applications éventuelles dans les domaines agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Pour aller plus loin dans ce travail, plusieurs points mériteraient d'être approfondis. D'un point de vue fondamental, il est indispensable de déterminer la structure chimique du nouveau produit formé dans la réaction « acide galacturonique-AF-Laccase », afin de savoir et de

comprendre le mécanisme réactionnel de la laccase agissant sur la pectine. Pour cela, il faut purifier ce nouveau produit ayant une masse de 629 g/mol, déterminer ses propriétés et sa structure chimique, notamment par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et par résonance magnétique nucléaire.

Il serait également intéressant de remplacer l'acide galacturonique par l'arabinose, celui-ci étant le sucre principal sur lequel l'acide férulique est naturellement présent dans la pectine de betterave. Il s'agirait d'appliquer le protocole enzymatique et de vérifier la présence de phénols greffés par des analyses structurales.

En ce qui concerne les propriétés physicochimiques des pectines fonctionnalisées, il serait intéressant de comparer leurs masses molaires par SEC-MALLS à celle de la pectine native, ce qui contribuerait à confirmer les modifications apportées. Enfin, afin de préciser les champs d'applications industrielles, l'étude de la viscosité des solutions fonctionnalisées ainsi que leur capacité à gélifier en fonction de la température, de l'agitation et du temps, devra être menée pour évaluer leur aptitude et leur stabilité.

En ce qui concerne l'assemblage des polysaccharides, il serait intéressant d'utiliser un plan d'expérience pour optimiser la taille des particules obtenu en fonction des différentes conditions utilisées. Les études préliminaires d'encapsulation et de libération sont à approfondir. Il faudrait optimiser l'encapsulation et vérifier la faisabilité du procédé sur une molécule hydrophile. Concernant, la stabilité et la libération du composé d'intérêt, il serait intéressant de les vérifier dans les conditions biologiques : pH et enzymes de la digestion.

A plus le long terme et pour développer et compléter ce travail, quelques pistes semblent prometteuses :

Conclusions et Perspectives

- Evaluer les activités antifongique et antibactérienne des pectines modifiées par rapport à la pectine native. L'observation visuelle de solutions de pectine native après une semaine montre la croissance de champignons à sa surface, alors qu'une solution de pectine fonctionnalisée conservée un mois dans le même environnement ne permet pas d'observer un développement fongique.
- Fabriquer des films comestibles à base de pectine et chitosane fonctionnalisés, tester leurs propriétés rhéologiques et mécaniques et les comparer à celles des films obtenus avec le polymère natif.
- Fabriquer des films comestibles à base de pectines fonctionnalisées par les deux approches puis étudier leurs propriétés physiques : épaisseur, couleur, cinétique de sorption de l'eau, perméabilité à la vapeur d'eau, résistance à la traction, allongement à la rupture, et microstructure des films composites. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier les propriétés antioxydantes et antibactériennes de ces films conçus comme des emballages actifs alimentaires. Des applications potentielles pourraient ainsi être imaginées pour l'encapsulation pour des utilisations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.
- Etudier le pouvoir antioxydant des microparticules à base de biopolymères fonctionnalisés et encapsulant un principe actif pour étudier le phénomène de relargage de la molécule d'intérêt dans le milieu simulant l'intestin.

Références bibliographiques

V. Références bibliographiques

Abang, Z. D. N., & Meyer Anne, S. (2013). Oxidative enzymatic gelation of sugar beet pectin for emulsion stabilization. *Research Journal of Biotechnology*, 8, 81-86.

Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Behrooz, R., Rezaei, M., & Miraki, R. (2013). Reducing water sensitivity of alginate bio-nanocomposite film using cellulose nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 166-173.

Acero, E. H., Ribitsch, D., Rodriguez, R. D., Dellacher, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Greimela, K.J., Schroederb, M., Kandelbauer, A., Heumannb S., Nyanhongob, G.S., Schwaba, H., Guebitz, G. M. (2012). Two-step enzymatic functionalisation of polyamide with phenolics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 79, 54-60.

Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-inflammatory Agent, Against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41, 40-59.

Aguiar-Oliveira, E., & Maugeri, F. (2011). Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 363-372.

Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., & Ballesteros, A. (2006). Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology*, 24, 281-287.

Alissandratos, A., Baudendistel, N., Flitsch, S. L., Hauer, B., & Halling, P. J. (2010). Lipase-catalysed acylation of starch and determination of the degree of substitution by methanolysis and GC. *Bmc Biotechnology*, 10, 82.

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Paris, C., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: a green procedure for the synthesis of new compounds. *Food Chemistry*, 145, 1046-1054.

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Revol-Junelles, A.-M., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry*, 161, 279-287.

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. (2015). Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 112, 25-39.

Références bibliographiques

- Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J., Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 87, 537-544.
- Amirthalingam, M., Kasinathan, N., Mutalik, S., & Udupa, N. (2015). In vitro biocompatibility and release of curcumin from curcumin microcomplex-loaded chitosan scaffold. *Journal of Microencapsulation*, 32, 364-371.
- Araujo, C. C., & Leon, L. L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 723-728.
- Asgher, M., Iqbal, H. M. N., Asad, M. J., & Asad, M. J. (2012). Kinetic characterization of purified laccase produced from *trametes versicolor* ibl-04 in solid state bio-processing of corncobs. *BioResources*, 7, 1171-1188.
- Asouri, M., Atatee, R., Ahmadi, A. A., Amini, A., & Moshaei, M. R. (2013). Antioxidant and free radical scavenging activities of Curcumin. *Asian Journal of Chemistry*, 25, 7593-7595.
- Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J. P., & Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33, 404-418.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215-242.
- Bangham, A. D., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8, 660-668.
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K., Xu, F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and environmental microbiology*, 63, 3151-3157.
- Birch, N. P., & Schiffman, J. D. (2014). Characterization of Self-Assembled Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Formed from Chitosan and Pectin. *Langmuir*, 30, 3441-3447.
- Boh, B. (2007). Développements et applications industrielles des microcapsules. In *Microencapsulation* (Tec et Doc, Lavoizier, p. 9-22). Paris: In Vandamme T, Poncelet D, Subra - Paternault P.

- Bozic, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2388-2398.
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P. V., Brijwani, K., Rigdon, A., & Vadlani, P. V. (2010). Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing, *Enzyme Research*, 149748.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309-319.
- Calafell, M., Díaz, C., Hadzhiyska, H., Gibert, J. M., Dagà, J. M., & Tzanov, T. (2007). Bio-catalyzed coloration of cellulose fibers. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25, 336-340.
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenguer, P., & Langendorff, V. (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 20, 901-907.
- Carrea, G., & Riva, S. (2008). *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. John Wiley & Sons, 328.
- Chandra, R., & Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17, 326-342.
- Chatjigakis, A. K., Pappas, C., N.Proxenia, O.Kalantzi, P.Rodis, & Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37, 395-408.
- Chen, J., Liu, W., Liu, C.-M., Li, T., Liang, R.-H., & Luo, S.-J. (2015). Pectin modifications: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1684-1698.
- Chen, Y., Mohanraj, V. J., & Parkin, J. E. (2003). Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. *Letters in Peptide Science*, 10, 621-629.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron (Oxford, England: 1993)*, 35, 93-96.
- Colombo, G., & Carrea, G. (2002). Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations. *Journal of Biotechnology*, 96, 23-33.
- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Quiévy, N., Danthine, S., Goffin, D., Jacquet, N., Blecker, C., Devaux, J., Paquot, M. (2013). Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 148-156.

- Cunha, A. G., & Gandini, A. (2010). Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates. *Cellulose*, 17, 1045-1065.
- Cusola, O., Valls, C., Vidal, T., & Roncero, M. B. (2013). Application of surface enzyme treatments using laccase and a hydrophobic compound to paper-based media. *Bioresource Technology*, 131, 521-526.
- Dec, J., Haider, K., & Bollag, J.-M. (2003). Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. *Chemosphere*, 52(3), 549-556.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Desai, S. S., & Nityanand, C. (2011). Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology*, 3, 98-124.
- Dong, A., Fan, X., Wang, Q., Yu, Y., & Cavaco-Paulo, A. (2015). Hydrophobic surface functionalization of lignocellulosic jute fabrics by enzymatic grafting of octadecylamine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 353-362.
- Duran, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 907-931.
- Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H., & Dongowski, G. (2007). Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids*, 21, 1101-1112.
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., & Orlandi, M. (2008). Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 84-92.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Fan, X., Zhang, C., Liu, D., Yan, J., & Liang, H. (2013). The Clinical Applications of Curcumin: Current State and the Future. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 2011-2031.

- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Fu, J., Nyanhongo, G. S., Gübitz, G. M., Cavaco-Paulo, A., & Kim, S. (2012). Enzymatic colouration with laccase and peroxidases: Recent progress. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30, 125-140.
- Galhaup, C., & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 225-232.
- Garcia-Nino, W. , Tapia, E., Zazueta, C., Zatarain-Barron, Z. , Hernandez-Pando, Z. L., Vega-García, C. C., & Pedraza-Chaverri, C. C. (2013). Curcumin Pretreatment Prevents Potassium Dichromate-Induced Hepatotoxicity, Oxidative Stress, Decreased Respiratory Complex I Activity, and Membrane Permeability Transition Pore Opening. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 19.
- Garcia, V. H., Vera, L. H., & Madsen, B. (2010). Turmeric curcumin compositions with low residual solvent, 9, 61-100.
- Garcia-Zamora, J. L., Sanchez-Gonzalez, M., Lozano, J. A., Jauregui, J., Zayas, T., Santacruz, V., Hernandez, F., Torres, E. (2015). Enzymatic treatment of wastewater from the *corn tortilla* industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content. *Process Biochemistry*, 50, 125-133.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1-26.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213-224.
- Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 21, 167-193.
- Godeck, R., Kunzek, H., & Kabbert, R. (2001). Thermal analysis of plant cell wall materials depending on the chemical structure and pre-treatment prior to drying. *European Food Research and Technology*, 213, 395-404.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L., & Doucet, O. (2007). Cosmetic or dermatological preparation with skin-lightening proteins.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.

Guo, M., Ma, Y., Wang, C., Liu, H., Li, Q., & Fei, M. (2015). Synthesis, anti-oxidant activity, and biodegradability of a novel recombinant polysaccharide derived from chitosan and lactose. *Carbohydrate Polymers*, 118, 218-223.

Guoning Fan, J. Z. (2006). Grafting modification of Kevlar fiber using *horseradish peroxidase*, *Polymer Bulletin*, 56, 507-515.

Gu, Q. M., & Cheng, H. N. (2005). Enzyme Catalyzed Esterification of Cellulosics Guar and Polyethers. *Polymer* 416, 1, 30-31

Haeri, A., Alinaghian, B., Daeihamed, M., & Dadashzadeh, S. (2014). Preparation and Characterization of Stable Nanoliposomal Formulation of Fluoxetine as a Potential Adjuvant Therapy for Drug-Resistant Tumors. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 13, 3-14.

Hakulinen, N., & Rouvinen, J. (2015). Three-dimensional structures of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72, 857-868.

Hocine, T., Amiri, O., Aït-Mokhtar, A., & Pantet, A. (2011). Nouvelle approche pour l'étude de la diffusion d'ions chlorures dans le béton : Prise en compte de l'effet de la double couche électrique.

Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., & Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*, 273, 2308-2326.

Holser, R. A. (2014). Near-Infrared Analysis of Peanut Seed Skins for Catechins. *American Journal of Analytical Chemistry*, 05(06), 378-383.

Hong, J. (2008). *Effects of agitation in emulsion polymerization-Kinetic and mechanistic study of coagulum*. Lehigh University.

Hossain, K. M. G., Gonzalez, M. D., Lozano, G. R., & Tzanov, T. (2009). Multifunctional modification of wool using an enzymatic process in aqueous-organic media. *Journal of Biotechnology*, 141, 58-63.

Hu, K., Huang, X., Gao, Y., Huang, X., Xiao, H., & McClements, D. J. (2015). Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chemistry*, 182, 275-281.

Ichikawa, S., Iwamoto, S., & Watanabe, J. (2005). Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 1637-1642.

Iijima, M., Nakamura, K., Hatakeyama, T., & Hatakeyama, H. (2000). Phase transition of pectin with sorbed water. *Carbohydrate Polymers*, 41, 101-106.

Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21(23), 2475-2490.

Jawahar, N., & Meyyanathan, S. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 1, 217.

Jelvehgari, M., Dastmalch, S., & Nazila, D. (2012). Theophylline-Ethylcellulose Microparticles: Screening of the Process and Formulation Variables for Preparation of Sustained Release Particles. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15, 608-624.

Jelvehgari, M., & Montazam, S. H. (2012). Comparison of Microencapsulation by Emulsion-Solvent Extraction/Evaporation Technique Using Derivatives Cellulose and Acrylate-Methacrylate Copolymer as Carriers. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7, 144-152.

Jeon, J.-R., Kim, E.-J., Murugesan, K., Park, H.-K., Kim, Y.-M., Kwon, J.-H., Kim, W.-G., Lee, J.-Y., Chang, Y.-S. (2010). Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microbial Biotechnology*, 3, 324-335.

Jiyoung Jung, L. W. (2012). Laccase mediated conjugation of heat treated β -lactoglobulin and sugar beet pectin. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1244-1249.

John, R. P., Tyagi, R. d., Brar, S. k., Surampalli, R. y., & Prévost, D. (2010). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31, 211-226.

Jung, J., & Wicker, L. (2012). Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 28, 168-173.

Jung, J., & Wicker, L. (2014). β -Lactoglobulin conformation and mixed sugar beet pectin gel matrix is changed by laccase. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 9-15.

Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27, 187-197.

- Kermasha, S., Bao, H., Bisakowski, B., & Yaylayan, V. (2002). Characterization of the biocatalysis of tyrosinase in selected organic solvent media using model phenolic substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 20, 335-345.
- Kim, S. Y., Zille, A., Murkovic, M., Guebitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2007, juin). Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1782-1787.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.
- Kobayashi, S., & Higashimura, H. (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science*, 28, 1015-1048.
- Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., & Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 195-208.
- Kumar, A., Dora, J., & Singh, A. (2011). A review on spice of life *Curcuma longa* (turmeric). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2, 371-379.
- Kumar, G., Smith, P. J., & Payne, G. F. (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 154-165.
- Kumavat, S. D., Chaudhari, Y. S., Borole, P., Mishra, P., Shenghani, K., & Duvvuri, P. (2013). Degradation studies of curcumin. *International Journal of Pharmacy Review & Research*, 3, 50-55.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications: a patent review. *Recent patents on biotechnology*, 2, 10-24.
- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J., & Autio, K. (2003). Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 17, 679-684.
- Lacki, K., & Duvnjak, Z. (1996). Modeling the enzymatic transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenoloxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 249-259.
- Lathasree, S., Rao, A. N., SivaSankar, B., Sadasivam, V., & Rengaraj, K. (2004). Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 223, 101-105.

- Lee, B. B., Ravindra, P., & Chan, E. S. (2013). Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. *Chemical Engineering & Technology*, 36, 1627-1642.
- Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Bebawy, M., Luk, F., Mason, R. S., & Rohanizadeh, R. (2013). Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology*, 11, 338-378.
- Legrand, P., Benoit, J. P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., & Passirani, C. (2007). Sphéroïdes et formes vectorisées. In *Pharmacie Galénique: Formulation et technologie pharmaceutique* (221-250).
- Lembo, D., & Cavalli, R. (2010). Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21, 53-70.
- Leshik, R. R. (1981). A dry stabilized curcumin-colorant additive. Brevets, EP 0037204 A1.
- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H.-H., & Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 285-294.
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, 26-39.
- Lin, W.-J., & Kang, W.-W. (2003). Comparison of chitosan and gelatin coated microparticles: prepared by hot-melt method. *Journal of Microencapsulation*, 20, 169-177.
- Littoz, F., & McClements, D. J. (2008). Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: Cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. *Food Hydrocolloids*, 22, 1203-1211.
- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., & Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, 101, 3268-3273.
- Liu, Y., Cai, Y., Jiang, X., Wu, J., & Le, X. (2016). Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin–chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 52, 564-572.
- Madhavi, V., & Lele, S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4, 1694-1717.
- Maghsoudi, S., Adibi, H., Hamzeh, M., Ashrafi-Kooshk, M. R., Rezaei-Tavirani, M., & Khodarahmi, R. (2013). Kinetic of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Benzaldehyde Derivatives. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 2, 156-164.
- Mahmmoud, Y. A. (2007). Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions. *British Journal of Pharmacology*, 150, 200-208.

- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3, 1377-1397.
- Margot, J., Bennati-Granier, C., Maillard, J., Blanquez, P., Barry, D. A., & Holliger, C. (2013). Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *AMB Express*, 3, 63.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551-565.
- Mazzarino, L., Loch-Neckel, G., Bubniak, L. D. S., Mazzucco, S., Santos-Silva, M. C., Borsali, R., & Lemos-Senna, E. (2015). Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15, 781-791.
- McMahon, A. M., Doyle, E. M., Brooks, S., & O'Connor, K. E. (2007). Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1435-1441.
- Mikolasch, A., Hahn, V., Manda, K., Pump, J., Illas, N., Gördes, D., Lalk, M., Salazar, M.G., Hammer, E., Jülich, W-D., Rawer, S., Thurow, K., Lindequist, U., Schauer, F. (2010). Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds. *Amino Acids*, 39, 671-683.
- Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer F, Gesell M, Hessel S, Jülich WD, Lindequist, U. (2006). Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes spec.* *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54, 632-638.
- Mikolasch, A., & Schauer, F. (2009). Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 605-624.
- Mishra, R. K., Banthia, A. K., & Majeed, A. B. A. (2012). Pectin based formulations for biomedical applications: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 1-7.
- Mitra, S. P. (2008). Stabilizing effect of chitosan on curcumin from the damaging action of alkaline pH and ultraviolet light. *Journal of Surface Science and Technology*, 24, 39-55.
- Mohamad Saad, M., Gaiani, C., Scher, J., Cuq, B., Ehrhardt, J. J., & Desobry, S. (2009). Impact of re-grinding on hydration properties and surface composition of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 49, 134-140.

- Moilanen, U., Osma, J. F., Winqvist, E., Leisola, M., & Couto, S. R. (2010). Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from *Trametes hirsuta* and *Cerrena unicolor*. *Engineering in Life Sciences*, 10, 242-247.
- Monfregola, L., Bugatti, V., Amodeo, P., De Luca, S., & Vittoria, V. (2011). Physical and water sorption properties of chemically modified pectin with an environmentally friendly process. *Biomacromolecules*, 12, 2311-2318.
- Moribe, H., Kitayama, Y., Suzuki, T., & Okubo, M. (2012). Effect of stirring rate on particle formation in emulsifier-free, organotellurium-mediated living radical emulsion polymerization (emulsion TERP) of styrene. *Polymer Journal*, 44, 205-210.
- Muhidinov, Z. K., Fishman, M. L., Avloev, K. K., Norova, M. T., Nasriddinov, A. S., & Khalikov, D. K. (2010). Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins. *Polymer Science Series A*, 52, 1257-1263.
- Muller, M. (2014). Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State I: Principles and Theory. *Advances in Polymer Science*, 229..
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., & Girardin, M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International*, 38, 995-1000.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., & Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 327-335.
- Nasseau, M., Boublik, Y., Meier, W., Winterhalter, M., & Fournier, D. (2001). Substrate-permeable encapsulation of enzymes maintains effective activity, stabilizes against denaturation, and protects against proteolytic degradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 615-618.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Omar Zaki, S. S., Ibrahim, M. N., Katas, H., Omar Zaki, S. S., Ibrahim, M. N., & Katas, H. (2015). Particle Size Affects Concentration-Dependent Cytotoxicity of Chitosan Nanoparticles towards *Mouse Hematopoietic Stem Cells*, *Journal of Nanotechnology*, 5.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*, 8.

Osorio, C., Carriazo, J. G., & Barbosa, H. (2011). Thermal and structural study of guava (*Psidium guajava* L) powders obtained by two dehydration methods. *Química Nova*, 34, 636-640.

O'Toole, M. G., Henderson, R. M., Soucy, P. A., Fasciotto, B. H., Hoblitzell, P. J., Keynton, R. S., Ehringer, W.D., Gobin, A. S. (2012). Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/Tween 20 particles. *Biomacromolecules*, 13, 2309-2314.

Ou, S., & Kwok, K.-C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261-1269.

Pannu, J. S., & Kapoor, R. K. (2014). Microbial laccases: a mini-review on their production, purification and applications. *International Journal of Pharmaceutical Archive*, 12, 528-536.

Pasanphan, W., Buettner, G. R., & Chirachanchai, S. (2010). Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research*, 345, 132-140.

Pelaz, B., del Pino, P., Maffre, P., Hartmann, R., Gallego, M., Rivera-Fernández, S., Jesus M. de la Fuente, J.M., Nienhaus, G.U., Parak, W. J. (2015). Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano*, 9, 6996-7008.

Pereira, L. M., Carmello-Guerreiro, S. M., & Hubinger, M. D. (2009). Microscopic features, mechanical and thermal properties of osmotically dehydrated guavas. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 378-384.

Picone, C. S. F., & Cunha, R. L. (2013). Chitosan–gellan electrostatic complexes: Influence of preparation conditions and surfactant presence. *Carbohydrate Polymers*, 94, 695-703.

Piermaria, J. A., de la Canal, M. L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22, 1520-1527.

Polak, J., & Jarosz-Wilkolazka, A. (2012). Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry*, 47, 1295-1307.

Prabaharan, M., & Mano, J. F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*, 12, 41-57.

Qian, C. (2013). Food-grade nanodispersions for encapsulation, protection and delivery of bioactive food components. *Doctoral Dissertations Available from Proquest*, 1-256.

- Quaratino, D., D'Annibale, A., Federici, F., Cereti, C. F., Rossini, F., & Fenice, M. (2007). Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on *Zea mays* L. seeds. *Chemosphere*, 66, 1627-1633.
- Reddy, K., Mohan, G. K., Satla, S., & Gaikwad, S. (2011). Natural polysaccharides: versatile excipients for controlled drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 275-286.
- Rencoret, J., Aracri, E., Gutiérrez, A., del Río, J. C., Torres, A. L., Vidal, T., & Martínez, A. T. (2014). Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers. *Biochemical Engineering Journal*, 86, 16-23.
- Ren, J., Li, Q., Dong, F., Feng, Y., & Guo, Z. (2013). Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: Synthesis and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 77-81.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ricardo, D., Andrade, P., Lemus M, R., Carmen, E., & Perez, C. (2011). Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. *Vitae*, 18, 325-334.
- Richard, J., Benoit, J.-P., & Venier-Julienne, M.-C. (2013). *Microencapsulation*. Ed. Techniques de l'Ingénieur.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24, 219-226.
- Rodriguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
- Sagis, L. M. C. (2015). *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Academic Press.
- Saikia, P. M., Boruah, B., Kakoty, B., & Hazarika, P. (2014). Effect of Association of Curcumin with Chitosan in Presence of TX 100 on Its Degradation. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35, 997-1002.
- Salleh, A. B., & Basri, M. (2006). *New Lipases and Proteases*. Nova Publishers, 148.
- Sameni, J., Krigstin, S., & Sain, M. (2015). Effect of Preparation Parameters on the Formation of Lignin Acetate Microspheres. *International Journal of Engineering and Innovative Technology*, 4, 102-113.

- Saravanan, M., & Rao, K. P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 80, 808–816.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G., & Pifferi, P. G. (1999). Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 285–289.
- Sharma, S., Saraogi, G. K., & Kumar, V. (2015). Development of spectrophotometric methods for simultaneous determination of artesunate and curcumin in liposomal formulation. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 7, 18–21.
- Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A. (2011). Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*, 217861, 11.
- Singh, A. V., Nath, L. K., Singh, A., & others. (2010). Pharmaceutical, food and non-food applications of modified starches: a critical review. *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9, 1214–1221.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In Lester Packer (éd.), *Methods in Enzymology* (299, 152–178). Academic Press.
- Slocum, T. L., & Deupree, J. D. (1991). Interference of biogenic amines with the measurement of proteins using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 195, 14–17.
- Solis-Oba, M., Almendariz, J., & Viniegra-Gonzalez, G. (2008). Biotechnological treatment for colorless denim and textil wastewater treatment with laccase and ABTS. *La Revista internacional de contaminación ambiental*, 24, 5–11.
- Srivastava, A. K., Ridhurkar, D. N., & Wadhwa, S. (2005). Floating microspheres of cimetidine: formulation, characterization and in vitro evaluation. *Acta Pharmaceutica* 55, 277–285.
- Sun, S. S., Xing, T., & Tang, R. C. (2015). Enzymatic dyeing and functional finishing of textile fibres with ferulic acid. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 40, 62–69.
- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids*, 20, 596–606.

- Thummala, A. S., Leach, J. K., & O'Rear, E. A. (2003). Factors affecting the particle size and in vitro release of bovine serum albumin from polyethylene glycol microparticles. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 39, 318-323.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Tizzotti, M., Charlot, A., Fleury, E., Stenzel, M., & Bernard, J. (2010). Modification of Polysaccharides Through Controlled/Living Radical Polymerization Grafting-Towards the Generation of High Performance Hybrids. *Macromolecular Rapid Communications*, 31, 1751-1772.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 180, 402-404.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J., & van Henegouwen, G. B. (1986). Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 183, 116-122.
- Urias-Orona, V., Huerta-Oros, J., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., & Gardea, A. A. (2010). Component analysis and free radicals scavenging activity of *Cicer arietinum* L. husk pectin. *Molecules*, 15, 6948-6955.
- Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F., & Vazquez-Duhalt, R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 380-385.
- Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67, 380-389.
- Visakh, P. M., Ozguz, B., & Guillermo, P. (2014). Polyelectrolytes: Thermodynamics and Rheology. *Engineering Materials*, 214.
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P., Narasimha, G. (2014). Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation, Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Enzyme Research*, *Enzyme Research*, e163242.
- Von Smoluchowski, M. (1921). In *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus* (Vol. 2). Barth, Leipzig, Germany.: L. Greated.
- Wallace, N., & Wrenn, S. P. (2015). Ultrasound triggered drug delivery with liposomal nested microbubbles. *Ultrasonics*, 63, 31-38.

- Wang, S.-Q., Ravindranath, S., Wang, Y., & Boukany, P. (2007). New theoretical considerations in polymer rheology: Elastic breakdown of chain entanglement network. *Journal of Chemical Physics*, 127, 064903.
- Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. (2014). Pectin extracted from *apple pomace* and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129-137.
- Wedlock, D. J. (2012). *Controlled Particle, Droplet and Bubble Formation* (Vol. chapter 9). Butterworth-Heinemann.
- Whitehurst, R. J., & Oort, M. V. (2009). *Enzymes in Food Technology*. John Wiley & Sons, 384.
- Witayakran, S., & Ragauskas, A. J. (2009). Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351, 1187-1209.
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 174-209.
- Xu, F. (1997). Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 924-928.
- Xu, F. (2001). Dioxygen reactivity of laccase: dependence on laccase source, pH, and anion inhibition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95, 125-133.
- Yamaguchi, M., Moore, T. W., Sun, A., Snyder, J. P., & Shoji, M. (2012). Novel curcumin analogue UBS109 potently stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis: involvement in Smad activation and NF- κ B inhibition. *Integrative Biology*, 4, 905-913.
- Yang, Y.-Y., Chung, T.-S., Bai, X.-L., & Chan, W.-K. (2000). Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*, 55, 2223-2236.
- Yang, Y. Y., Chung, T. S., & Ng, N. P. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22, 231-241.
- Zaidel, D. N. A., Chronakis, I. S., & Meyer, A. S. (2012). Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology. *Food Hydrocolloids*, 28, 130-140.
- Zanin, M. P., Pettingill, L. N., Harvey, A. R., Emerich, D. F., Thanos, C. G., & Shepherd, R. K. (2012). The development of encapsulated cell technologies as therapies for neurological and

Références bibliographiques

sensory diseases. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 160, 3-13.

Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., & Liu, D. (2013). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 222-231.

Zhang, Y., Jia, X., Wang, L., Liu, J., & Ma, G. (2011). Preparation of Ca-Alginate Microparticles and Its Application for Phenylketonuria Oral Therapy. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 4106-4112.

Zhang, Z., & Feng, S.-S. (2006). The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials*, 27, 4025-4033.

Zuidam, N. J., & Nedovic, V. (2009). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Food Science & Nutrition.

Impact de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine par des composés phénoliques sur la structure et les propriétés physicochimiques du polymère

Cette thèse porte sur la fonctionnalisation de la pectine de citron par des composés phénoliques. Une première stratégie a consisté à greffer les produits issus de l'oxydation de l'acide férulique (AF), en milieu aqueux (pH 7,5, 30 ° C), en présence de la laccase de *Myceliophthora thermophila* (obtention de pectine F). L'enjeu était de démontrer le greffage covalent de composés phénoliques exogènes sur le polysaccharide, de recueillir des informations sur la structure et les propriétés du polymère fonctionnalisé et de les comparer aux caractéristiques du polymère natif. Une deuxième stratégie de fonctionnalisation de la pectine a été envisagée, basée sur l'adsorption des produits d'oxydation de l'AF sur la pectine (obtention de pectine POX). Quel que soit le mode de fonctionnalisation, des analyses biochimiques ont montré l'incorporation de composés phénoliques dans la pectine. La structure et les propriétés des pectines modifiées dépendent du type de fonctionnalisation subie par le polysaccharide (greffage covalent ou adsorption). Des analyses structurales suggèrent que le greffage covalent de phénols fait intervenir les fonctions carboxyles de la pectine (formation de liaisons ester) sur lesquelles des oligomères d'acide férulique viendraient se lier. Les propriétés des pectines fonctionnalisées (POX et F) et de la pectine native ont été étudiées et comparées afin de mettre en évidence les changements apportés. L'étude des propriétés thermiques des différentes poudres de pectine suggèrent une structure moins organisée et moins compacte pour les polymères fonctionnalisés par rapport à la pectine native. L'activité antioxydante des pectines fonctionnalisées est améliorée tandis que leur caractère hygroscopique est diminué en raison de l'incorporation de composés phénoliques hydrophobes. De même que la pectine native, les pectines POX et F présentent un profil rhéofluidifiant. Toutefois, la viscosité et la vitesse de gélification mesurées dans le cas de la pectine F sont significativement diminuées par rapport à celles obtenues pour la pectine native. La pectine POX présente un comportement intermédiaire. Des résultats préliminaires d'assemblages ont montré qu'il est possible d'associer la pectine native ou modifiée à un autre polysaccharide, le chitosane. Les microparticules obtenues ont montré leur capacité à encapsuler un principe actif tel que la curcumine.

Mots-clefs : pectine, laccase, acide férulique, oxydation enzymatique, propriétés physicochimiques, chitosane, assemblage, encapsulation, curcumine.

Impact of the enzymatic functionalization of pectin with phenolic compounds on the structure and the physicochemical properties of the polymer

This dissertation concerns the functionalization of the citrus pectin with phenolic compounds. A first strategy consisted in grafting the products issued from the oxidation of ferulic acid (FA), in aqueous medium (pH 7,5, 30 ° C), in the presence of the laccase of *Myceliophthora thermophila* (pectin F). The main objectives were to demonstrate the covalent grafting of exogenous phenols onto the polysaccharide, to collect information about the structure and the properties of the modified polymer and to compare them with the characteristics of the native one. A second strategy of functionalization was applied, based on the adsorption of FA oxidation products onto the pectin (pectin POX). Whatever the functionalization pathway, biochemical analyses showed the incorporation of phenolic compounds into the pectin. The structure and the properties of the modified pectins depended on the type of modification undergone by the polysaccharide (covalent grafting or adsorption). Structural analyses suggested that the covalent grafting of phenols involved the carboxyl groups of the pectin (ester bound) on which FA oligomers were bound. The properties of native and modified pectins (POX and F) were studied and compared aiming to highlight the changes brought by functionalization. The study of the thermal properties of pectin POX and F suggested less organized and less compact structures compared to the native one. The antioxidant activity of the modified pectins was improved whereas their hygroscopic character was decreased because of the incorporation of hydrophobic phenolic compounds. As the native pectin, the pectins POX and F presented a shear-thinning profile. However, the viscosity and the gelation rate measured for the pectin F were significantly decreased, compared with those obtained for the native pectin. The pectin POX presented an intermediate behavior. Preliminary results of assemblies demonstrated the possibility to associate the native or modified pectin to another polysaccharide, the chitosan, leading to microparticles capable to encapsulate an active ingredient such as the curcumin.

Keywords: pectin, laccase, ferulic acid, enzymatic oxidation, physicochemical properties, assembly, chitosan, encapsulation, curcumin.