



HAL
open science

Etude structurale des chaines laterales des pectines de betterave

Fabienne Guillon, J.F. Thibault

► **To cite this version:**

Fabienne Guillon, J.F. Thibault. Etude structurale des chaines laterales des pectines de betterave. Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales, 1987, 181 (6), pp.707-717. <hal-02720336>

HAL Id: hal-02720336

<https://hal.inrae.fr/hal-02720336v1>

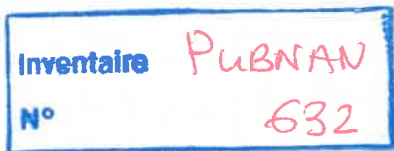
Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



C. R. Soc. Biol., 1987, 181, 707-717.

Biochimie végétale.

**Étude structurale des chaînes latérales
des pectines de betterave**

par F. GUILLON et J.-F. THIBAUT

*Laboratoire de Biochimie et Technologie des Glucides,
INRA, rue de la Géraudière, 44072 Nantes Cedex 03.*

(reçue le 2 décembre 1987).

Summary. — The hairy fragments of beet pulp pectic substances (fragments of rhamnogalacturonan carrying neutral sugar side chains) have been subjected to acid and enzymic degradations and methylation. A special attention was paid to feruloyl ester groups. The results show that the hairy fragments of beet pectins consist of fairly branched arabinans and more linear galactans. Some traces of xylose are also detected. Feruloyl ester groups are covalently linked to the hairy fragments. 30 % are linked to the arabinosyl fraction and the remaining to the galactosyl fraction.

Résumé. — Les zones branchées (fragments du squelette rhamnogalacturonique portant des chaînes latérales d'oses neutres) ont été soumises à des perméthylations et des dégradations chimiques et enzymatiques. Une attention particulière a été portée à la localisation des groupes féruloyles. Les résultats montrent que les chaînes latérales comportent des arabinanes hautement branchés, des arabinogalactanes de type I peu branchés et des arabinogalactanes de type II plus ramifiés. Les groupes féruloyles sont liés de façon covalente aux zones branchées. 30 % sont liés aux résidus arabinosyles, le reste semble associé aux résidus galactosyles.

Les pulpes de betterave constituent un sous-produit de l'industrie sucrière bon marché et abondant. Ces pulpes contiennent environ 30 % de pectines. Cette teneur est comparable à celle des marcs de pomme et d'écorces d'agrumes mais les pulpes de betterave ne peuvent être utilisées en substitution de ceux-ci comme source de pectines commerciales en raison du mauvais pouvoir gélifiant des pectines extraites. Des études récentes, réalisées par Rombouts et Thibault (1, 2), ont montré que les pectines de betterave sont composées de régions homogalacturoniques ou zones « lisses » juxtaposées à des régions rhamnogalacturoniques portant des chaînes latérales d'oses neutres ou zones « branchées ».

Ces pectines présentent deux caractéristiques intéressantes et originales. Elles possèdent des groupes acétyles liés par des liaisons esters au moins à 75 % des acides galacturoniques dans les zones lisses (3) qui seraient responsables du mauvais pouvoir gélifiant des pectines (4). La deuxième caractéristique concerne la présence de groupes féruloyle liés par des liaisons esters aux chaînes latérales d'oses neutres. Des faits analogues sont reportés sur des pectines d'épinard (5). Un nouveau mode de gélification a été proposé sans addition d'ions calcium ou de saccharose; il repose sur la réticulation des pectines par « couplage » des résidus féruliques de deux chaînes pectiques en présence d'un agent oxydant, tel que le système peroxydase-peroxyde d'hydrogène (6) ou le persulfate d'ammonium (7). Ce nouveau procédé est susceptible d'offrir de nouvelles possibilités de valorisation des pectines extractibles des pulpes de betterave.

Afin de préciser la localisation des groupes féruloyle, nous avons procédé à une étude structurale des pectines de betterave. Les pectines ont été extraites à partir d'un matériel insoluble dans l'alcool par de l'acide chlorhydrique 0,05 N à 80° C. Les zones « branchées » ont été isolées et la structure des chaînes latérales d'oses neutres a été étudiée par des méthodes chimiques et/ou enzymatiques.

Matériel et méthodes. — PRÉPARATION DES PECTINES PURIFIÉES ET DE LEURS ZONES BRANCHÉES. — L'extraction des pectines par de l'acide chlorhydrique 0,05 N à 80° C à partir d'un matériel insoluble dans l'alcool (MIA) et la préparation des zones branchées en utilisant une endopolygalacturonase ont été réalisées selon le protocole décrit par Rombouts et Thibault (1, 2).

CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLÉCULAIRE. — Les pectines ou les pectines dégradées (6 mg) sont injectées sur une colonne de Sépharose Cl-2B (86 × 2,6 cm) ou de Sépharose CL-6B (50 × 1,6 cm), éluées à un débit de 20 ml/h par un tampon acétate de sodium (pH 4) de force ionique 0,1 M. Les oligosides sont injectés sur une colonne de Biogel P2 (203 × 1,5 cm), thermostatée à 65° C et élue à un débit de 50 ml/h par de l'eau.

LES MÉTHODES ANALYTIQUES. — La teneur en acide galacturonique a été déterminée par la méthode au méthahydroxydiphényl, automatisée par Thibault (8). Les oses neutres sont analysés sous forme de leurs acétates d'alditols par chromatographie en phase gazeuse (9). Ils sont détectés dans les éluats de colonne par la méthode à l'orcinol (10).

La teneur en groupes féruloyle est mesurée par spectrophotométrie à $\lambda = 375$ nm et à pH 10 en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 31 600 (5).

L'analyse des liaisons glycosidiques par perméthylation est réalisée selon la méthode d'Hakomori (11) modifiée par Lomax et Conchie (12).

HYDROLYSE ACIDE MÉNAGÉE. — Les zones branchées (10 mg) sont dispersées dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,05 N (0,5 ml) pendant 1 heure à 100° C. L'hydrolysats est injecté sur une colonne de Biogel P2 éluée par de l'eau. Les fractions sont analysées comme décrit ci-dessus.

HYDROLYSE ENZYMATIQUE. — Les zones branchées sont incubées en présence d'une arabinofuranosidase, d'une endoarabinanase et d'une endogalactanase purifiées (13, 14). Les conditions de réaction sont les suivantes : les zones branchées (10 mg) sont incubées en présence de l'enzyme (arabinofuranosidase, endoarabinanase ou endogalactanase) dans un tampon acétate de sodium 0,05 M pH 4 à 30° C pendant des temps variables. Les produits d'hydrolyse sont analysés par chromatographie liquide haute pression selon la méthode de Voragen et coll. (15).

Résultats et discussion. — **EXTRACTION DES PECTINES.** — Le rendement en pectines brutes à partir du MIA est de 18,7 %. La teneur en acide galacturonique est de 44,4 %. Ces pectines ont été purifiées par précipitation par l'acétate de cuivre. La teneur en acide galacturonique après purification s'élève à 55,8 %.

COMPOSITION ET PROPRIÉTÉS DES PECTINES PURIFIÉES. — La composition et les propriétés sont indiquées dans le tableau I. Les pectines présentent

TABLEAU I. — Caractéristiques chimiques et viscosimétriques des pectines, de leurs zones branchées et des résidus d'hydrolyses chimique et enzymatique.

Fraction	Pectines	Zones branchées	Résidu TFA 0,05 N	Résidu enzymatique
Rendement (%)		29,0 (a)	54,7 (b)	58,8 (b)
Ac galacturonique	55,8	17,6	32,2	29,4
Oses neutres				
Rhamnose	2,8	7,2	13,2	12,2
Arabinose	12,4	45,8	26,7	31,4
Xylose	0,3	0,8	1,1	1,4
Mannose	—	—	—	—
Galactose	4,7	17,9	25,8	25,5
Glucose	0,2	0,6	1,1	—
Méthanol	6,3 (64,1)	—	—	—
Acide acétique	4,4 (23,5)	—	—	—
Groupes féruloyles	0,7 (1,8)	1,8 (1,7)	2,4 (3,4)	1,9 (3,25)
Protéines (N × 6,25)	3,8	5,1	nd	nd
[η] ml/g	247	42,3	nd	nd
Coefficient de Huggins	0,56	1,34	nd	nd
Mv	45 800	12 300	nd	nd

Les nombres entre parenthèses correspondent respectivement aux degrés de méthylation, d'acétylation et de féruloylation.

(a) exprimés relativement aux pectines purifiées.

(b) exprimés relativement aux zones branchées.

nd : non déterminé.

une teneur élevée en oses neutres (20,4 %) comparativement aux pectines de marcs de pomme ou d'écorces d'agrumes. L'arabinose, le galactose et le rhamnose sont les oses neutres prépondérants. Le degré de méthylation (64 %) est plus faible que celui des pectines de pomme et agrumes. Les pectines se différencient de ces dernières par leur teneur en groupes acétyles (4,4 %) et par la présence de groupes féruloyles (0,7 %). La masse moyenne viscosimétrique est relativement faible par rapport à celle des pectines de pomme et de citrus. La chromatographie des pectines purifiées sur gel de Sépharose CL-2B (Fig. 1) montre une distribution large des masses moléculaires. Le rapport acide galacturonique/osés neutres n'est pas constant, ce qui indique une hétérogénéité chimique des pectines. Les pectines présentent des caractéristiques similaires à celles obtenues pour la même fraction par Rombouts et Thibault (1).

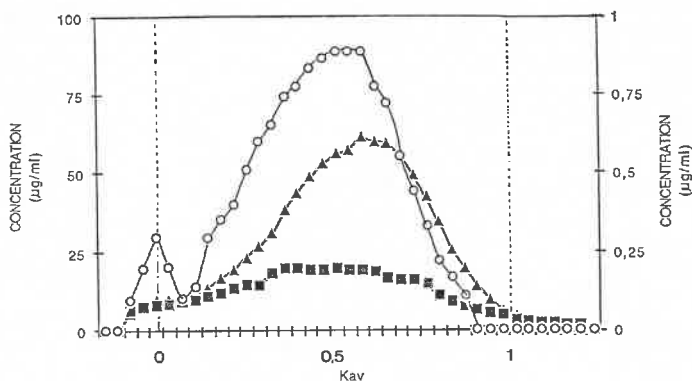


FIG. 1. — Chromatogramme des pectines purifiées sur gel de Sépharose CL-2B.
 ▲ : acide galacturonique; ■ : oses neutres; ○ : acide férulique (échelle de droite)

OBTENTION ET CARACTÉRISATION DES ZONES BRANCHÉES. — L'action de l'endopolygalacturonase sur les pectines purifiées, préalablement déméthylées et désacétylées, met en évidence un matériel de haute masse moléculaire, riche en oses neutres, résistant à l'hydrolyse enzymatique qui peut être séparé des oligomères de l'acide galacturonique par chromatographie de tamisage moléculaire (Fig. 2). Ce résultat peut s'interpréter par l'existence dans les pectines de betterave de zones lisses, homogalacturoniques, juxtaposées à des zones branchées, riches en oses neutres. Des structures similaires sont observées pour les pectines de pomme (16, 17, 18), de cerise (19), de raisin (20).

La composition et les propriétés des zones branchées sont indiquées dans le tableau I. Elles présentent un rapport molaire oses neutres/acide galacturonique égal à 5,1. L'arabinose, suivi du galactose puis du rhamnose sont les oses neutres prépondérants. Elles contiennent tous les

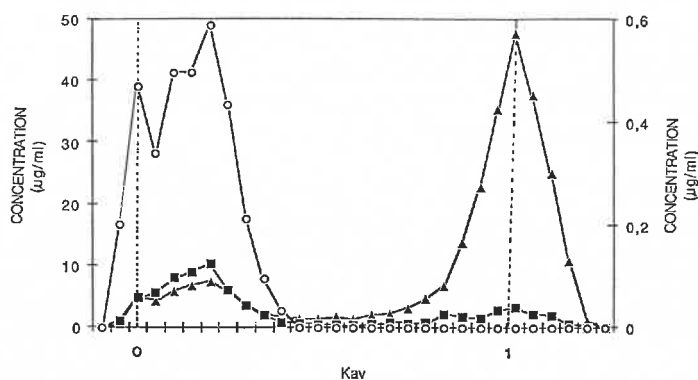


FIG. 2. — Chromatogramme sur gel de Séphacryl S200 des produits de dégradation par l'endopolygalacturonase des pectines déméthylées et désacétylées.

▲ : acide galacturonique; ■ : oses neutres; ○ : acide férulique (échelle de droite).

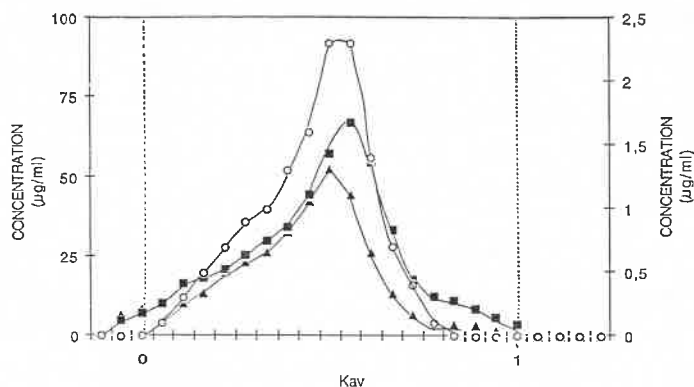


FIG. 3. — Chromatogramme sur gel de Sépharose CL-6B des zones branchées.

▲ : acide galacturonique; ■ : oses neutres; ○ : acide férulique (échelle de droite).

résidus féruliques. La masse moyenne viscosimétrique est de 12 300, en supposant que la relation de Owens et coll. (21) s'applique à ces molécules. La chromatographie des zones branchées sur gel de Sépharose CL-6B (Fig. 3) montre que les zones branchées pectines présentent une plus grande homogénéité chimique et une distribution plus étroite des masses moléculaires que les pectines initiales. Les zones branchées isolées sont très proches de celles caractérisées à partir de la même fraction par Rombouts et Thibault (2).

ÉTUDE STRUCTURALE DES CHAINES LATÉRALES DES ZONES BRANCHÉES.

— *Analyse des liaisons glycosidiques par perméthylation.* — Les résultats de méthylation sont rapportés dans le tableau II. 16 acétates d'alditol

TABLEAU II. — Analyse quantitative des dérivés méthylés par chromatographie en phase gazeuse des zones branchées initiales et après hydrolyse par le TFA 0,05 N.

Résidus glycosylés	Position des groupes méthyles	Position des liaisons	Quantité pour cent	
			Zones branchées	Résidus TFA 0,05 N
Arabinofuranose	2,3,5	Termf	22,8	7,6
Arabinopyranose	2,3,4	Termp	1,0	—
Arabinofuranose	3,5	2	0,5	—
	2,5	3	0,5	3,5
	2,3	5	20,3	20,4
	2	35	16,7	4,6
	3	25	1,6	—
		235	2,7	1,0
Total			66,1 (67,6)	37,1 (39,3)
Galactopyranose	2,3,4,6	Term	8,1	17,4
	2,4,6	3	2,6	—
	2,3,6	4	8,6	20,1
	2,3,4	6	—	—
	2,3	46	—	5,2
	3,6	24	—	—
	6	234	—	—
	2,6	43	1,8	—
	2,4	36	2,5	—
		2346	—	—
Total			23,6 (21,3)	42,7 (38)
Rhamnose	3,4	2	6,2	11,6
	3	24	4,1	8,6
Total			10,3 (11,1)	20,2 (19,4)

Les nombres entre parenthèses correspondent aux pourcentages molaires obtenus à partir des oses parentaux sous forme de leurs acétates d'alditols.

partiellement méthylés sont séparés. La réaction de méthylation est complète comme l'attestent le bon accord entre la composition en oses neutres obtenue en calculant la somme des dérivés méthylés issus du même sucre et celle obtenue par l'analyse directe et le rapport oses neutres terminaux/oses branchés voisin de l'unité. Ces résultats mettent clairement en évidence la présence de structure d'arabinanes et d'arabino-galactanes de types I et II. Les arabinanes sont constitués de résidus arabinosyles liés en α -(1,5), fortement branchés et dont le C³ constitue le point de branchement. Ces caractéristiques rappellent celles décrites pour les arabinanes pectiques (22 à 25). Les galactanes de type I, composés en majeure partie de galactose lié en β -(1,4), peu ramifiés et de faible degré de polymérisation sont majoritaires relativement aux arabino-

galactanes de type II, constitués de résidus galactosyles liés en (1,3), (1,6) et (1,3,6) et fortement ramifiés. L'existence d'arabinogalactanes de type II en tant que chaînes latérales d'autres molécules a déjà été signalée (26). Ces diverses chaînes latérales seraient attachées au squelette rhamnogalacturonique au niveau du C⁴ des résidus rhamnosyles.

Hydrolyses acides ménagées. — Le profil d'éluion de l'hydrolysate sur Biogel P2 est présenté sur la figure 4. Il est caractérisé par la présence de

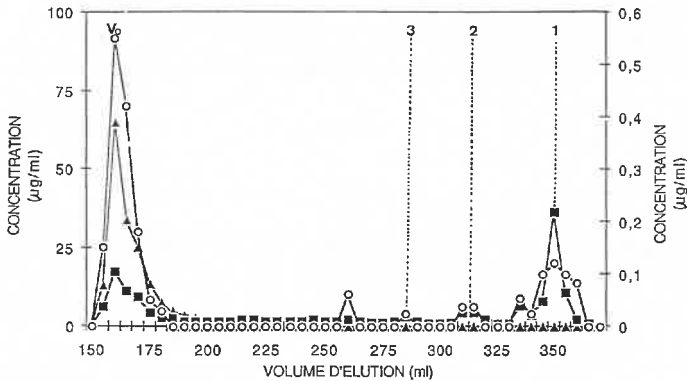


FIG. 4. — Chromatogramme sur gel de Biogel P2 des produits d'hydrolyse par le TFA 0,05 N (1 h à 100° C) des zones branchées.

▲ : acide galacturonique; ■ : oses neutres; ○ : acide férulique (échelle de droite).

pics numérotés de 1 à 3 et par la présence d'un matériel élué au V_0 de la colonne. De très faibles quantités d'acide galacturonique sont éluées dans le domaine de fractionnement de la colonne. 77,6 % de l'arabinose natif, 35,3 % du galactose natif et 46 % des groupes féruloyles sont libérés. 84,5 % de l'arabinose libéré et 41 % du galactose libéré sont retrouvés à l'état de monomère dans le pic 1. Ce dernier contient en addition des composés comprenant un résidu glycosidique (arabinose ou galactose) associé par des liaisons esters à un résidu férulique. Leur présence au sein de ce pic, attestée par l'existence d'un maximum d'absorption à 375 nm à pH 10 sur le spectre d'absorption (250 nm à 450 nm), résulterait vraisemblablement d'interactions entre le gel et le composé phénolique. Le matériel élué au V_0 représente 54,7 % des zones branchées initiales. La composition osidique est indiquée dans le tableau I. Les oses neutres représentent 67,8 % de la fraction glycosidique. La teneur en arabinose a diminué au profit de la teneur en galactose et en rhamnose. La teneur en groupes féruloyles relativement aux zones branchées initiales a augmenté. Les résultats de l'analyse des liaisons glycosidiques sont reportés dans le tableau II. Comme précédemment, la réaction de méthylation semble satisfaisante. Comparativement aux zones branchées initiales, on observe une diminution des

dérivés arabinosyles terminaux liés en position 3 et 5 alors que la proportion d'arabinose lié en (1,5) n'a pas diminué. La composition en dérivés méthylés des fractions galactosidiques et rhamnosidiques n'est que peu modifiée. Le traitement par le TFA 0,05 N, 1 h à 100° C, élimine donc très rapidement les résidus arabinofuranosyles en position périphérique ce qui se traduit par une linéarisation de la fraction arabinane. Parallèlement, mais en plus faible proportion, des résidus galactosyles et féruloyles sont éliminés. Il n'a pas été possible de déterminer la proportion de groupes féruloyles liés à la fraction arabinosyle et celle liée à la fraction galactosyle.

La chromatographie de perméation sur Sépharose CL-6B des résidus d'hydrolyse (Fig. 5) indique qu'il y a eu une modification importante du volume hydrodynamique des molécules, entraînant un déplacement dans le volume total de leur volume d'éluion. Il n'est guère possible à ce stade de préciser si ces modifications sont imputables à la dégradation des chaînes latérales ou à une altération du squelette rhamnogalacturonique.

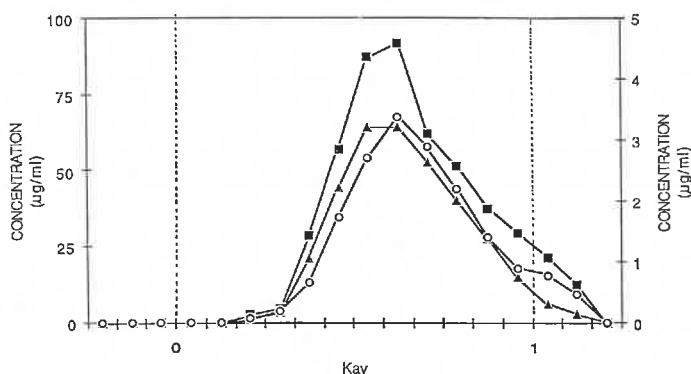


FIG. 5. — Chromatogramme sur gel de Sépharose CL-6B des zones branchées dégradées par le TFA 0,05 N.

▲ : acide galacturonique; ■ : oses neutres; ○ : acide férulique (échelle de droite).

Hydrolyses enzymatiques. — Par l' α -L-arabinofuranosidase. — La cinétique de dégradation est montrée sur la figure 6. Deux phases peuvent être différenciées, une première où l'on observe une hydrolyse rapide (23 % des résidus arabinosyles sont libérés) et une seconde où l'hydrolyse est plus lente. Des résultats analogues sont obtenus sur les arabinanes de betterave (13, 14). La première phase correspondrait à une linéarisation de la molécule par élimination des ramifications et la seconde phase à une dépolymérisation par hydrolyse récurrente de l'axe principal de l'arabinane. L'arabinose, à l'état de monomère, est le principal produit de dégradation. Au maximum 55 % des résidus arabinosyles sont libérés.

Par l'endoarabinanase. — L'endoarabinanase se montre faiblement

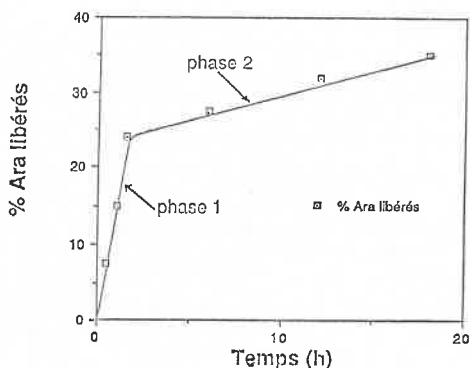


FIG. 6. — Cinétique d'hydrolyse des zones branchées par l'arabinofuranosidase II. Phase 1 : linéarisation de l'arabinane; phase 2 : dépolymérisation de l'arabinane.

active sur les zones branchées; la présence de larges zones de résidus arabinosyles non substitués n'est donc pas probable. Les produits engendrés sont principalement un di- et un triarabinoside.

Ces divers résultats démontrent que les résidus arabinose sont sous forme furanose avec une anomérie α . Ils corroborent les résultats précédents, à savoir un haut degré de substitution (principalement en C³) des résidus arabinofuranosyles. Ces points de branchement, le long de l'axe principal de l'arabinase, ne sont pas groupés mais distribués au hasard.

Hydrolyse séquentielle. — Les zones branchées sont successivement soumises à une hydrolyse par l'arabinofuranosidase (24 h) puis l'endoarabinanase (1 h 30) et enfin l'endogalactanase (1 h 30). 43,1 % des oses neutres et 36,5 % des résidus féruliques sont libérés sous l'action de ces enzymes. Plus précisément, 59,6 % de l'arabinose, 11 % du galactose et 26 % des résidus féruliques sont libérés par l'action de l'arabinofuranosidase puis de l'endoarabinanase. L'endogalactanase libère 16 % du galactose natif sous forme de di- et trigalactosides et 11 % des résidus féruliques. Le résidu d'hydrolyse comporte toujours une fraction arabinosyle mais celle-ci a tendance à diminuer au profit de la fraction rhamnogalacturonique et du galactose. La chromatographie sur Sépharose CL-6B (Fig. 7) montre que les zones branchées dégradées sont éluées à un même K_{av} que les zones branchées initiales indiquant que l'hydrolyse séquentielle affecte les chaînes latérales d'oses neutres sans altérer le squelette rhamnogalacturonique. Cela confirme également le haut degré de ramification des chaînes latérales d'arabinose qui sont les chaînes d'oses neutres majoritaires.

Conclusion. — Les pectines de betterave présentent un certain nombre de caractères remarquables qui sont leur forte teneur en oses neutres, particulièrement en arabinose, leur faible masse moléculaire, leur degré

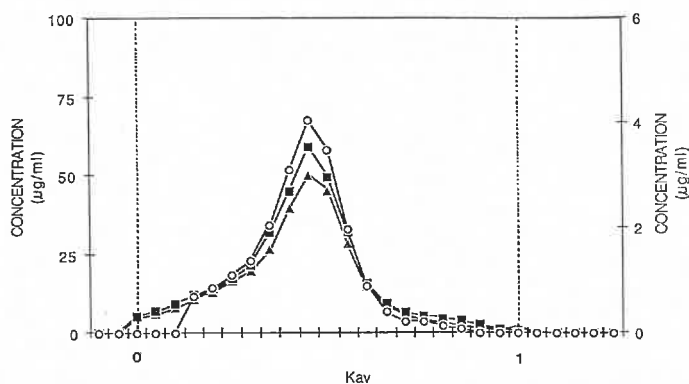


FIG. 7. — Chromatogramme sur gel de Sépharose CL-6B des zones branchées soumises à une hydrolyse enzymatique séquentielle (arabinofuranosidase, endo-arabinanase, endogalactanase).

▲ : acide galacturonique; ■ : oses neutres; ○ acide férulique (échelle de droite).

d'acétylation et la présence de groupes féruloyle. L'action d'une endopolygalacturonase a montré l'existence de zones homogalacturoniques, « lisses », dégradées par l'enzyme et de zones rhamnogalacturoniques, « branchées », riches en chaînes latérales résistantes à l'enzyme. La perméthylation, associée à l'hydrolyse acide ménagée et/ou enzymatique a permis d'établir la structure des chaînes latérales. Les pectines possèdent des chaînes latérales de structure complexe. On y distingue principalement des arabinanes mais aussi des arabinogalactanes de type I. Le rhamnose est concentré dans les zones branchées et est lié en (1,2) et fait partie du squelette pectique. 40 % de ces résidus sont également substitués au niveau du C⁴ par des chaînes latérales. Les groupes féruloyle apparaissent localisés dans les zones branchées. Environ 30 % sont associés à la fraction arabinosyle et sont libérés en même temps que cette dernière. Ils seraient vraisemblablement localisés à l'extrémité non réductrice des chaînes d'arabinose. Le reste serait lié à la fraction galactosyle et semble plus ou moins aisément accessible.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rombouts F. M. & Thibault J. F., *Carbohydr. Res.*, 1986, 154, 177-188.
2. Rombouts F. M. & Thibault J. F., *Carbohydr. Res.*, 1986, 154, 189-203.
3. Rombouts F. M. & Thibault J. F., in *Chemistry and Function of Pectins*, ACS Symposium Series n° 310, M. L. Fishmann et J. J. Jen eds, American Chemical Society, 1987, 49-60.
4. Phippen G. L., Mac Creedy R. M. & Owens H. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 813-816.
5. Fry S. C., *Biochem. J.*, 1982, 203, 493-504.

6. Rombouts F. M., Thibault J. F. & Mercier C., Fr. Pat., 1983, 8.307.208; *Chem. Abstr.*, 1985, 102, 60792U.
7. Thibault J. F. & Rombouts F. M., *Carbohydr. Res.*, 1986, 154, 205-215.
8. Thibault J. F., *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1979, 12, 247-251.
9. Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J. & Stone B. A., *Carbohydr. Res.*, 1983, 113, 291-299.
10. Tollier M. T. & Robin J. P., *Ann. Technol. Agric.*, 1979, 28, 1-15.
11. Hakomori S., *J. Biochem.*, 1984, 55, 205-208.
12. Lomax J. A. & Conchie J., *J. Chromatogr.*, 1982, 236, 385-394.
13. Rombouts F. M., Voragen A. G. J., Searle-Van Leeuwen M. J. F., Gercads C. C. J. M., Schols H. A. & Pilnik W., 1987. Soumis pour publication dans *Carbohydr. Polymers*.
14. Voragen A. G. J., Rombouts F. M., Searle-Van Leeuwen M. J. F., Schols H. A. & Pilnik W., 1987, Contrat CEE EN-3B-0090-NL.
15. Voragen A. G. J., Schols H. A., Searle-Van Leeuwen M. J. F., Beldman G. & Rombouts F. M., *J. Chromatogr.*, 1986, 370, 113-120.
16. De Vries J. A., Den Uyl C. H., Voragen A. G. J., Rombouts F. M. & Pilnik W., *Carbohydr. Polymers*, 1983, 3, 193-205.
17. De Vries J. A., Rombouts F. M., Voragen A. G. J. & Pilnik W., *Carbohydr. Polymers*, 1982, 2, 25-33.
18. Rouau X. & Thibault J. F., *Carbohydr. Polymers*, 1984, 4, 111-125.
19. Thibault J. F., *Phytochemistry*, 1983, 22, 1567-1571.
20. Saulnier L. & Thibault J. F., *Carbohydr. Polymers*, 1987, sous presse.
21. Owens H. S., Lotzkar H., Schultz T. H. & Maclay W. D., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, 1628-1632.
22. Hirst E. L., Rees D. A. & Richardson N. G., *Biochem. J.*, 1965, 95, 453-456.
23. Aspinall G. O. & Cottrell I. W., *Can. J. Chem.*, 1971, 49, 1019-1022.
24. Siddiqui I. R. & Wood P. J., *Carbohydr. Res.*, 1974, 36, 35-44.
25. Stevens B. J. H. & Selvendran R. R., *Phytochemistry*, 1980, 19, 559-561.
26. Clarke A. E., Anderson R. I. & Stone B. A., *Phytochemistry*, 1979, 18, 521-540.

