

Recherches

sur le brunissement non enzymatique des fruits et des produits de fruits en conserve

par **André PATRON**

INGÉNIEUR I. C. P., LICENCIÉ ÈS SCIENCES,
TECHNOLOGUE A L'INSTITUT DES FRUITS
ET AGRUMES COLONIAUX.

Cet article résume les parties les plus importantes de la thèse soutenue le 2 juin 1949, en vue du grade de « Doctor of Philosophy », à l'Université de Massachusetts, sous la présidence de M. le professeur Fellers, directeur du Département de Technologie Alimentaire.*

La bonne conservation de la couleur naturelle des aliments sucrés en conserve, en particulier des produits dérivés des fruits, est un des problèmes les plus ardues de ceux qui se posent aux industriels.

La plupart du temps, au cours de l'entreposage, il se produit un brunissement qui nuit beaucoup à la présentation de ces denrées. Il semble même que leur valeur nutritive se trouve modifiée, mais les données manquent sur ce point, sauf en ce qui concerne l'acide ascorbique.

L'apparition de pigments bruns au sein d'un produit naturel, tel qu'un jus de fruit, peut être due soit à l'action de certains enzymes oxydants agissant sur les polyphénols (dans ce cas le brunissement est très rapide), soit à une transformation n'impliquant pas de catalyseur biologique, mais n'excluant pas l'action de catalyseurs métalliques, ou d'autres substances. Ce dernier cas, généralement désigné par l'expression : « brunissement non enzymatique », fait l'objet du présent travail. Il est d'ailleurs légitime de séparer le brunissement enzymatique du brunissement non enzymatique, puisque l'un des objets de l'appertisation est précisément l'inactivation des enzymes, c'est-à-dire l'élimination du premier type d'altération de la couleur.

* A. Patron. — « Studies of the mechanisms involved in food darkening », Thèse de Doctorat, University of Massachusetts, Amherst, Mass. (U. S. A.), 1949.

Les causes reconnues du brunissement non enzymatique, dans le cas des jus de fruits par exemple, sont soit l'introduction de métaux, tels que le fer ou le cuivre provenant de l'appareillage ou des récipients, soit le contact prolongé avec l'oxygène atmosphérique, au cours de la préparation ou pendant l'entreposage, soit enfin l'exposition à une température élevée (pasteurisation trop poussée ou entreposage à des températures supérieures à 20°). Cependant, même si toutes les précautions sont prises pour éviter ces causes de brunissement (appareillage et récipients inattaquables, désaération, flash-pasteurisation, mise en flacons sous vide), les jus prennent lentement à 20° environ une teinte brune qui s'accroît au cours du temps. Le procédé le plus efficace pour retarder le brunissement consiste sans doute à entreposer les jus à des températures voisines de + 4°. Dans ces conditions, le jus d'orange se conserve au moins pendant un an sans changement de couleur si toutes les autres précautions mentionnées ont été prises. (Cf. LAVOLLAY et PATRON [1].) Toutefois, la réfrigération représente un procédé assez coûteux pour qu'on tente de l'éviter. L'étude d'un phénomène dont le mécanisme reste très mal connu malgré les efforts de nombreux chercheurs, présente par ailleurs quelque intérêt.

STADTMAN [2] écrit dans une revue de la littérature : « La lenteur avec laquelle a évolué notre compréhension de la chimie des réactions est surtout due au fait que les recherches ont été dirigées dans le but de trouver un remède au brunissement, sans avoir d'abord trouvé la cause. » Cet auteur a tenté de classer les explications proposées par différents chercheurs ; elles se ramènent à trois types principaux :

i. Théorie de la condensation des sucres réducteurs

et des acides aminés, connue aussi sous le nom de réaction de Maillard.

2. Théorie de l'acide ascorbique, ou des diénols.

3. Théorie des « aldéhydes actifs », ou des « furfurals ».

Quelques explications paraissent nécessaires au sujet de ces trois théories.

La réaction de MAILLARD [3] suppose la condensation directe d'un sucre réducteur et d'un acide aminé avec formation de pigments bruns (mélanoïdines), dont la structure reste encore à déterminer. Cette réaction s'accompagne d'un dégagement de gaz carbonique.

La présence de sucres réducteurs et d'acides aminés dans les produits en question a fait penser à cette explication. L'analogie des mélanoïdines synthétiques, cependant mal connues malgré les efforts de ENDERS [4], avec les pigments bruns naturels extraits de jus d'oranges brunis [5] ou d'abricots séchés [6], a rendu cette théorie plausible. Un argument supplémentaire est fourni par certains auteurs qui ont montré que du gaz carbonique se dégagait des jus d'oranges en cours de brunissement, mais ce fait est contesté en ce qui

concerne les jus non concentrés (Cf. STADTMAN [2]). Toutefois, les concentrés de jus d'orange peuvent dégager une quantité de gaz carbonique suffisante pour gonfler les boîtes et même les faire éclater [7].

Un dernier argument en faveur de cette théorie provient du fait que l'anhydride sulfureux, même à très faible dose, inhibe aussi bien la réaction de MAILLARD que le brunissement des jus de fruits.

La présence de sucres et d'acides aminés dans de très nombreux aliments autres que les fruits rend cette explication valable dans presque tous les cas de brunissement non enzymatique, en lui donnant une portée très générale. Elle a été acceptée par exemple dans le cas du brunissement de certains types de fromages, de la poudre d'œufs et de lait, des mélasses et de la bière au cours de la cuisson du moût.

La seconde théorie, au contraire, s'applique plus spécialement aux produits de fruits puisqu'elle considère l'acide ascorbique et ses produits d'oxydation comme les intermédiaires responsables du brunissement. Il a en effet été maintes fois démontré que la formation de pigments bruns dans les jus de fruits s'accompagne

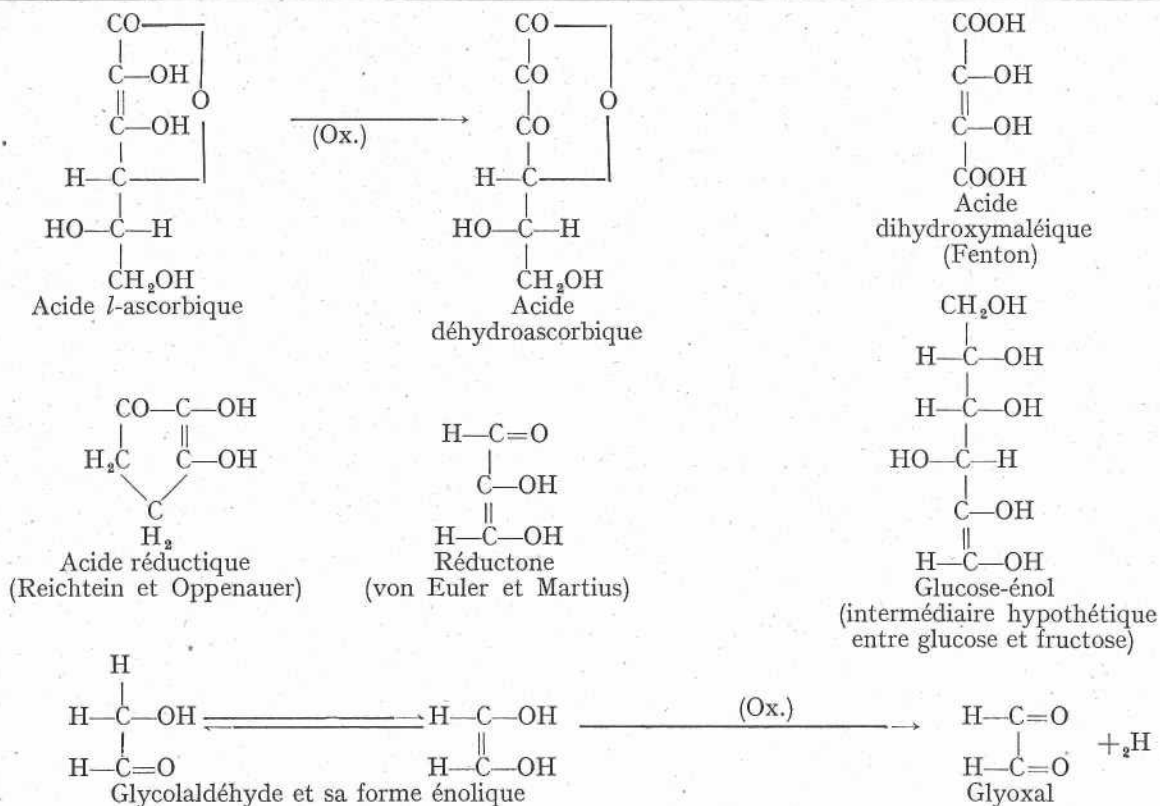


FIG. 1. — Structure de quelques diénols naturels et synthétiques et de certains de leurs produits d'oxydation.

d'une diminution sensible de leur teneur en acide ascorbique [8]. Il a même été reconnu que l'enrichissement artificiel en acide ascorbique augmente le taux du brunissement, si des précautions ne sont pas prises pour empêcher son oxydation. Cependant, le fait que l'acide ascorbique inhibe le brunissement [9] et le fait que l'acide déhydroascorbique se décompose à la température ordinaire en libérant du gaz carbonique, compliquent singulièrement le problème.

D'autre part, les composés à fonction diénolique tels que l'acide *d*-isoascorbique, l'acide dihydroxymaléique, la réductone et l'acide réductique (*Figure 1*) semblent se comporter exactement comme l'acide ascorbique, ils diminuent le taux de brunissement s'ils restent à l'état réduit (diénol), mais l'augmentent s'ils viennent à s'oxyder (α -dicétone). Ils sont en général plus sensibles à l'oxydation que l'acide ascorbique lui-même. Ces diénols sont encore très mal connus, car ce sont des composés extrêmement labiles, ainsi que leurs produits d'oxydation. En dépit de ce manque de données, beaucoup d'auteurs n'hésitent pas à parler de « réductones » chaque fois que des substances très réductrices apparaissent dans un milieu sucré. Ces réductones sont généralement considérées comme responsables à la fois des difficultés rencontrées dans le dosage de l'acide ascorbique et de certains cas de brunissement.

Il faut noter que le rôle présumé des composés α -dicétoniques dans la formation des pigments bruns rappelle de façon curieuse la théorie précédente puisque ENDERS [4] estime que le sucre est probablement transformé en α -dicétones telles que le méthylglyoxal, le glyoxal ou le diacétyle, avant d'entrer en réaction avec l'acide aminé, dans la réaction de MAILLARD.

La troisième explication envisagée, c'est-à-dire la théorie des « aldéhydes actifs » ou des « furfurals » n'est pas non plus sans parenté avec la réaction de MAILLARD. Dans cette théorie, il est admis que les sucres se transforment en dérivés du furfural, lesquels peuvent soit se condenser avec des acides aminés, soit se polymériser pour engendrer des pigments bruns. La présence des doubles liaisons conjuguées rend en effet la fonction aldéhydique particulièrement réactive; il est de fait que les dérivés du furfural sont très sensibles à l'oxydation, à la polymérisation et à la condensation.

La présence à peu près constante de traces de 5-hydroxyméthylfurfural dans les jus de fruits et dans de nombreux autres produits sucrés ayant subi un chauffage semble justifier cette théorie.

HAAS et ses collaborateurs [10] ont montré que les furfurals jouent un rôle dans le brunissement des abricots séchés; ces auteurs estiment que les sucres, les acides uronique, réductique, ascorbique, et les sub-

stances apparentées, sont les précurseurs du furfural et de ses dérivés.

Toutefois, SATTLER et ZERBAN [11] pensent que la structure furanique n'apparaît pas à basse température. D'autres auteurs estiment que le pH doit, de plus, être inférieur à 5, sinon aucun furfural ne se forme, quelle que soit la température.

Enfin, la formation intermédiaire de furfural a été signalée comme mécanisme possible de la réaction de MAILLARD. (Cf. ENDERS [4].) Le mécanisme de cette réaction est très mal connu et pourrait, comme il a été vu, englober les mécanismes des deux autres théories envisagées.

Il est vraisemblable que la « réaction de MAILLARD » constitue en réalité un ensemble de réactions complexes entre les sucres réducteurs, les acides aminés et leurs produits de dégradation. C'est sans doute pourquoi, aussi bien les mélanoidines synthétiques [4], [12], que les pigments extraits des jus de fruits [5], sont toujours des mélanges de plusieurs substances aux propriétés différentes. Des arguments irréfutables tels que la présence d'azote dans les pigments bruns extraits des jus de fruits ou des abricots séchés permettent de penser qu'au moins certaines réactions faisant intervenir les acides aminés sont en cause. Il semble bien en outre que les sucres et les substances apparentées aux sucres jouent un rôle important dans ces réactions. Les conditions physico-chimiques des aliments susceptibles de brunir (température, pH, concentration des divers constituants) ne font sans doute qu'orienter ces réactions.

NATURE DES RÉACTIONS EN CAUSE DANS LE BRUNISSEMENT

La question posée par ce titre constitue le fond du problème. Comme il y a relativement peu d'accord entre les auteurs cités ci-dessus, non seulement au sujet des conserves, mais même au sujet des réactions qui se produisent dans un système simple tel qu'une solution de glucose et de glyocolle, il fut décidé d'aborder cette étude sous divers angles.

Rôle des composés à fonction diénolique.

L'une des suggestions met en cause l'acide ascorbique et son produit d'oxydation. Étant donné que ces substances ne sont pas présentes de façon absolument constante dans les denrées susceptibles de brunir, il semblait intéressant de savoir si d'autres diénols pouvaient jouer un rôle similaire. L'acide dihydroxyma-

léique fut choisi pour cette étude en raison de la simplicité de sa molécule (voir *figure 1*) et de la facilité de sa préparation. Il peut en effet être aisément préparé à partir d'acide tartrique par oxydation au moyen d'eau oxygénée en présence de fer (méthode de FENTON [13]).

Les résultats indiquent que l'acide dihydroxymaléique ajouté soit à des jus d'orange, soit à des jus de pomme produit un brunissement intense en l'espace de quelques jours, à la dose de 0,1 à 0,2 %, en présence d'oxygène. Les effets sont, au contraire, pratiquement nuls en l'absence d'oxygène. Le taux de brunissement

est augmenté très sensiblement si les jus sont en outre artificiellement enrichis en acides aminés. Le *Tableau I* reproduit une expérience typique. Du jus d'orange pasteurisé et filtré fut additionné de diverses doses d'acide dihydroxymaléique en combinaison ou non avec du glyocolle. Une série de tubes fut scellée sans précaution spéciale (A) tandis que dans l'autre série l'atmosphère surmontant le jus fut remplacée par de l'azote pur (N). Tous les tubes furent ensuite pasteurisés par passage de cinq minutes dans un bain-marie à 95°. Le pourcentage de lumière transmise, mesuré au photocolorimètre Evelyn et exprimé en unités arbitraires

TABLEAU I.

Action de l'acide dihydroxymaléique et du glyocolle sur le jus d'orange filtré conservé à 37° en présence et en absence d'oxygène.

| N° | CONCENTRATION DES SUBSTANCES AJOUTÉES AU JUS : | | POURCENTAGE DE LUMIÈRE TRANSMISE* POUR LA LONGUEUR D'ONDE 420 m μ : | | | | | |
|----|--|---------------|---|---------|----------|-----------------------------|---------|----------|
| | ACIDE DIHYDROXYMALÉIQUE % | GLYCOLLE % | SÉRIE A (OXYGÈNE PRÉSENT) | | | SÉRIE N (OXYGÈNE ABSENT) | | |
| | | | début | 7 jours | 14 jours | début | 7 jours | 14 jours |
| 1 | 0,0 | 0,0 | 80 | 63 | 58 | 80 | 79 | 81 |
| 2 | 0,1 | 0,0 | 80 | 63 | 55 | 80 | 75 | 68 |
| 3 | 0,2 | 0,0 | 80 | 55 | 50 | 80 | 70 | 69 |
| 4 | 0,0 | 0,4 | 80 | 63 | 59 | 80 | 77 | 81 |
| 5 | 0,1 | 0,4 | 80 | 40 | 29 | 80 | 70 | 68 |
| 6 | 0,2 | 0,4 | 80 | 24 | 20 | 80 | 63 | 62 |

* Mesurée au photocolorimètre Evelyn et exprimée en unités arbitraires. L'eau distillée est considérée comme transmettant 100 % dans les mêmes conditions.

pour le filtre de 420 m μ était dans tous les cas au début de l'expérience de 80 %. L'eau distillée servant à ajuster l'appareil était considérée comme ayant un coefficient de transmission de 100 %. Les tubes furent placés dans une étuve réglée à 37°. Les pourcentages de lumière transmise après respectivement 7 et 14 jours à la fois sous azote et sous atmosphère ordinaire (air) ont été reportés dans le *Tableau I* en regard des additions faites au jus d'orange initial. On peut noter que le jus qui n'a reçu aucune addition (tube n° 1) et même le jus qui n'a reçu que du glyocolle (tube n° 4) se comportent exactement de la même façon sous azote (pas de changement, aux erreurs d'expérience près dans la série N) et sous atmosphère normale (brunissement

égal dans la série A). Ceci ne veut d'ailleurs pas dire que des différences ne seraient pas apparues si l'expérience avait été prolongée plus longtemps.

D'autre part, l'acide dihydroxymaléique entraîne (tubes 2 et 3, série A) un brunissement considérable en présence d'oxygène. L'effet est particulièrement intense si le jus est enrichi en glyocolle (tubes 5 et 6, série A). Ceci tend à prouver que l'acide dihydroxymaléique ou ses produits de décarboxylation ne réagissent pas sous leur forme diénolique, mais bien sous leur forme dicétonique (c'est-à-dire oxydée) et correspond au fait déjà connu que l'acide ascorbique doit subir l'oxydation avant de former des pigments bruns. Le léger brunissement observé dans les tubes 2, 3, 5 et 6 de la série N

peut provenir de la présence d'acide dioxytartrique (dicéto succinique) dans l'acide dihydroxymaléique utilisé. Un titrage à l'iode a en effet indiqué une pureté de 90 % environ de ce produit, mais le virage est beaucoup moins net que dans le cas du titrage de l'acide ascorbique.

L'analogie d'action de l'acide dihydroxymaléique et de l'acide ascorbique va même beaucoup plus loin. En particulier, l'addition de cette substance à un jus de pomme ou d'orange produit immédiatement un éclaircissement de la teinte (bleaching) probablement dû à la réduction de certains pigments quinoniques ou flavoniques. Un jus de baie rouge se trouve *complètement décoloré* par quelques instants d'ébullition en présence d'acide dihydroxymaléique. Une solution de bleu de méthylène est réduite à la lumière comme par l'acide ascorbique. Ces deux diénols donnent des colorations identiques avec certains métaux : orangée avec les sels de titane en solution plus ou moins acide et violette avec les sels de fer en solution alcaline.

Il semble que la formation de pigments bruns aux dépens de l'acide ascorbique et de l'acide dihydroxymaléique soit en rapport avec leur fonction diénolique, ou peut-être avec le groupement $—CO—C(OH):C(OH)—$ qui comprend deux doubles liaisons conjuguées. L'oxydation de ce groupement rend la molécule qui le renferme particulièrement instable et capable, soit de se polymériser, soit de se condenser avec des amines. Il serait intéressant de savoir si la réductone de VON EULER et MARTIUS [14] et l'acide réductique de REICHTEN et OPPENAUER [15] possèdent des propriétés semblables et si elles sont, en particulier, susceptibles de former des pigments bruns dans les mêmes conditions.

Réaction du glyocolle avec l'acide ascorbique et l'acide dihydroxymaléique.

Pour serrer le problème de plus près, il fut jugé nécessaire d'étudier qualitativement la formation de pigments bruns dans des cas aussi simples que possible.

L'acide dihydroxymaléique et le glyocolle, en solution aqueuse diluée, réagissent avec formation d'une coloration brune par chauffage. La réaction semble plus rapide à pH 3,0-4,0. Aucune coloration n'apparaît en solution diluée en l'absence d'aminé ou d'acide aminé.

L'acide ascorbique conduit à des résultats différents et inattendus. Ainsi, une coloration rose est obtenue par oxydation ménagée de solutions diluées d'acide ascorbique et d'une amine, ou d'ammoniaque, en milieu acide ; une coloration possédant un spectre

d'absorption presque identique est obtenue par simple chauffage d'une solution alcaline d'acide ascorbique très diluée. La première de ces réactions a été décrite par KOPPANYI et ses collaborateurs [16] et la seconde par UTIGER [17]. Nous avons constaté de plus que, dans le premier cas, il n'est pas nécessaire d'oxyder l'acide ascorbique si celui-ci est remplacé par de l'acide déhydroascorbique ; cela montre que c'est bien ce dernier qui réagit, comme le supposait Koppanyi [16]. Les essais ont indiqué en outre que l'intensité maximum de coloration est obtenue pour des concentrations équimoléculaires de glyocolle et d'acide ascorbique. Cependant, si la substance colorée qui apparaît dans la réaction de KOPPANYI [16] est bien la même que dans la réaction d'UTIGER [17], on conçoit mal le rôle de l'acide aminé dans la première. Le point important à noter ici est que les amines en milieu acide, d'une part, et les bases alcalines, d'autre part, semblent capables de produire des transformations identiques dans certaines molécules dérivées de sucres.

Cette coloration rose peut représenter un stade intermédiaire dans les transformations de l'acide ascorbique au cours de la formation des pigments bruns, car elle est peu stable et tend à virer au jaune brun dans le cas où elle est produite en présence de glyocolle (réaction de KOPPANYI).

L'addition de soude caustique au produit de réaction de l'acide dihydroxymaléique et du glyocolle, d'une part, et au produit de réaction de l'acide ascorbique et du glyocolle, d'autre part, fournit des solutions rouge sang virant au jaune par dilution, avec déplacement du maximum d'absorption (d'abord à 520-530 m μ) vers les courtes longueurs d'onde et disparition progressive. Les spectres des deux solutions sont superposables pour une dilution choisie, et pour toutes les dilutions préparées à partir de celle-ci dans des rapports égaux.

Cette coloration rouge n'a pas été comparée à celle qui est obtenue par agitation à l'air d'une solution de furfural en milieu alcalin, mais elle y ressemble beaucoup ; le virage au jaune est observé dans les deux cas. Il semble d'ailleurs que les pigments bruns formés aux dépens des acides ascorbique et dihydroxymaléique possèdent une structure dérivée de celle du furfural.

FENTON [13] a montré en particulier que l'acide dihydroxymaléique en solution se transforme spontanément en glycolaldéhyde par décarboxylation. La décarboxylation est très rapide à 60°. Le glycolaldéhyde se polymérise ensuite en une substance qu'il n'a pu identifier, mais qui paraissait être un tétrose ; il se formait aussi, par oxydation, une substance amorphe de couleur jaunâtre.

Réactions du glycolaldéhyde avec certains phénols.

Le glycolaldéhyde obtenu par simple chauffage d'une solution d'acide dihydroxymaléique est capable de fournir un grand nombre de réactions colorées avec les

polyphénols utilisés à la recherche des sucres, dans des conditions semblables. Ces colorations sont représentées dans le *Tableau II*, avec en regard les colorations obtenues en présence de furfural et d'hydroxyméthylfurfural. Certaines des réactions du glycolaldéhyde ne peuvent être obtenues qu'après oxydation

TABLEAU II.

Réactions colorées du glycolaldéhyde, du furfural et du 5-hydroxyméthylfurfural avec certains réactifs phénoliques utilisés à la détection des sucres.

| RÉACTIF | GLYCOLALDÉHYDE(1) | FURFURAL (2) | 5-HYDROXYMÉTHYL-FURFURAL (2) |
|---|-------------------|--------------|------------------------------|
| Alpha-naphtol dans SO_4H_2 concentré (Molisch)..... | Bleu foncé | Violet | Violet |
| Beta-naphtol dans SO_4H_2 concentré..... | Vert olive | Rouge cerise | Bleu foncé |
| Résorcinol dans HCl 12 % (Seliwanoff).... | Orange à violet * | Orange | Rouge cerise |
| Résorcinol dans SO_4H_2 concentré..... | Rouge cerise | Orange | — |
| Phloroglucinol dans SO_4H_2 concentré..... | Rouge cerise | Orange | — |
| Phloroglucinol dans HCl 20 % (Tollens).. | Violet* | Rouge cerise | Jaune brun |

(1) Obtenu par ébullition de deux minutes d'une solution aqueuse d'acide dihydroxymaléique.

(2) La plupart des colorations indiquées ici sont des données classiques.

* La coloration violette n'apparaît qu'après traitement par quelques gouttes d'eau oxygénée.

de la solution au moyen d'eau oxygénée ; telles sont la réaction de TOLLENS et la réaction de SELIWANOFF. Les autres sont obtenues directement sur la solution de glycolaldéhyde ayant subi quelques instants d'ébullition. Bien que les colorations soient différentes de celles obtenues en présence de furfural et de 5-hydroxyméthylfurfural, les réactions présentent toutes

une grande sensibilité. Ceci tendrait en somme à montrer que le plus simple diénoï qui soit, le glycolaldéhyde sous sa forme énolique, est capable de donner naissance à des dérivés du furfural. La valeur de ces tests est malheureusement trop faible pour permettre de tirer une conclusion formelle.

(A suivre.)

