

Sur quelques méthodes utilisées pour l'étude des matières pectiques et des enzymes pectolytiques des abricots et des conserves d'abricots⁽¹⁾

par **J.-L. JOUX**,
Ingénieur C. N. A. M.

Préserver la forme et la texture des produits alimentaires d'origine végétale, ainsi qu'une fermeté suffisante — propriétés que les industriels désignent par le terme de « tenue » — constitue un problème d'un grand intérêt commercial qui a déjà retenu l'attention des chercheurs, problème particulièrement important pour l'appertisation de certaines variétés d'abricots cultivées en France.

Le procédé classique d'« affermissement au calcium » expérimenté en 1948 au laboratoire de l'Institut Appert, n'a pas permis d'obtenir d'amélioration sensible de la « tenue » des fruits de la variété « Rouge du Roussillon ». Une étude approfondie des facteurs qui influent sur la fermeté des abricots appertisés a donc été entreprise à partir de 1954 dans ce laboratoire et a été suivie d'essais d'appertisation effectués en usine. La première partie a constitué la matière d'une thèse d'ingénieur C. N. A. H. (chimie agricole et biologique) soutenue par l'auteur en 1956 et l'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet de communications récentes à l'Académie d'agriculture de France⁽²⁾.

Ce travail a montré le rôle joué par les différents composés pectiques et enzymes pectolytiques des abricots dans leur « tenue » à l'appertisation. Nous donnons ici une description des principales méthodes de laboratoire qui ont été utilisées pour l'étude de ces composés pectiques et de ces enzymes pectolytiques.

L'étude du rôle des matières pectiques dans le maintien de la fermeté des conserves d'abricots (23, 24, 25) a nécessité l'emploi de méthodes de dé-

termination portant sur les matières pectiques elles-mêmes et sur les enzymes pectolytiques. Certaines d'entre elles sont classiques. Ne seront dé-

crites dans le présent article, que celles qui ont été modifiées ou mises au point pour les adapter à l'objet de cette recherche.

DOSAGE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DE MATIÈRES PECTIQUES DANS LES ABRICOTS

a) Extraction fractionnée.

Une prise d'essai de 50 g de fruits découpés en petits tronçons est broyée dans un « mixeur » en présence d'alcool à 96 %, bouillant, de manière que la

(1) Service de Recherches de l'Institut Appert, 44, rue d'Alésia, Paris; Laboratoire de Chimie Agricole et Biologique, Conservatoire National des Arts et Métiers, Professeur : J. Lavollay.

(2) C. R. Acad. Agr. France, 43, 9, 506 (1957) C. R. Acad. Agr. France, sous presse.

concentration finale de l'alcool dans le mélange soit de 65-70 %. La partie insoluble est séparée et lavée plusieurs fois à l'alcool à 70 % par centrifugation et décantation. Le but de ce traitement est d'inactiver les enzymes, d'éliminer les sucres et les acides et d'insolubiliser la totalité des matières pectiques (1, 2, 3, 4). L'insoluble est extrait à deux reprises par chacun des réactifs suivants :

— l'eau distillée froide dans laquelle

les pectines riches en méthoxyles passent en pseudo-solution ;

— l'oxalate d'ammonium en solution aqueuse à 0,2 % qui dissout les pectines pauvres en méthoxyles ;

— l'acide chlorhydrique 0,05 N à 85° C qui transforme la protopectine insoluble en pectine soluble.

Des méthodes d'extraction comparables sont utilisées depuis quelques années par différents auteurs (2, 3, 4, 5, 6, 7).

b) *Dosage colorimétrique de l'acide polygalacturonique dans les solutions d'extraction.*

Il a été utilisé pour le dosage, la réaction colorée entre l'acide galacturonique, l'acide sulfurique et le carbazol découverte par DISCHE (8, 9) et déjà appliquée aux déterminations quantitatives des substances pectiques par plusieurs auteurs (5, 7, 10). La coloration rose-violette qui se développe présente un maximum d'absorption à 530 m μ . Elle est spécifique des acides hexuroniques comme l'a montré DISCHE, mais certaines substances donnent des colorations parasites, les sucres réducteurs en particulier donnent une coloration brune et doivent être éliminés. Il se développe souvent une coloration bleu pâle à vert intense qui a été attribuée à la présence de traces d'oxydants tels que les nitrates apportés quelquefois par l'acide sulfurique. Elle peut être évitée en traitant l'acide sulfurique à chaud par une petite quantité d'acide hypophosphoreux qui présente, par ailleurs, l'avantage de stabiliser la coloration. La sensibilité de la réaction diminue quand on passe de l'acide mono-galacturonique aux acides polygalacturo-

niques, aussi l'étalonnage est-il effectué à l'aide d'une pectine de teneur en uronide bien déterminée (cette teneur peut être déterminée par la méthode de décarboxylation Lefèvre-Tollens ou par précipitation du pectate de calcium (1)).

Réactifs.

1. Solution-étalon d'acide polygalacturonique :

Peser un poids de pectine de degré de pureté élevé correspondant à 150 mg de polyuronide pur. Dissoudre la pectine dans l'eau chaude et la saponifier en alcalinisant par 50 ml de soude N. Ajuster le volume de la solution à 1 000 ml. A partir de cette solution, préparer des dilutions permettant l'étalonnage de 0 à 150 γ /ml.

2. Acide sulfurique traité par l'acide hypophosphoreux :

A 990 ml d'acide sulfurique pour analyses, ajouter 10 ml d'acide hypophosphoreux en solution à 50 %. Porter le mélange 20 minutes à 100° C en agitant.

3. Alcool à 96 % purifié :

Distiller à reflux 1 l d'alcool à

96 % avec 4 g de poudre de zinc et 2 ml d'acide sulfurique concentré pendant 15 h. Distiller, puis redistiller en présence de 4 g de zinc et de 4 g de potasse.

4. Réactif au carbazol :

Dissoudre, dans 100 ml d'alcool purifié (3), 100 mg de carbazol recristallisé dans le toluène.

Mode opératoire.

Alcaliniser les solutions d'extraction par la soude à une concentration finale 0,05 N. Ajouter 2 ml de ces solutions à 12 ml d'acide sulfurique (2) placés dans des tubes « Pyrex » 22 \times 220, en agitant dans un bain de glace. Plonger les tubes 20 minutes dans un bain-marie bouillant et les refroidir rapidement dans la glace jusqu'à la température ordinaire. Ajouter dans chaque tube 1 ml de réactif au carbazol (4). Agiter. Effectuer la lecture colorimétrique 55 minutes \pm 5 après l'addition du carbazol. Pour chaque solution d'extraction préparer un témoin en remplaçant la solution de carbazol par 1 ml d'alcool purifié (3). La coloration suit la loi de BEER-LAMBERT, à 530 m μ de 0 à 150 γ /ml. Exprimer les résultats en acide polygalacturonique.

TABLEAU 1.

Libération du méthanol dans les abricots et les tomates broyées en fonction du temps à la température ordinaire.

| Abricots (Rouge du Roussillon n° 4) pH = 3,40 | | | | Tomates broyées pH = 4,50 | |
|---|-----------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------------------|
| Fruits broyés | | Fruits broyés + 200 unités de pectase de tomate/g | | | |
| Temps | CH ₃ OH mg/100 g | Temps | CH ₃ OH mg/100 g | Temps | CH ₃ OH mg/100 g |
| 0 h. | 2 | 0 h. | 2 | 0 h. | 2 |
| 4 h. 00 | 2 | 1 h. 25' | 20 | 0 h. 11' | 18 |
| | | 3 h. 09' | 24 | 0 h. 50' | 25 |
| 23 h. 40' | 4 | 6 h. 29' | 30 | 1 h. 25' | 27 |
| | | 6 h. 54' | 32 | 6 h. 19' | 28 |
| | | 23 h. 34' | 40 | | |
| CH ₃ OH total libérable : 72 | | CH ₃ OH total libérable : 64 | | CH ₃ OH total libérable : 38 | |

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA PECTINE-MÉTHYLESTÉRISE (PECTASE) DANS LES FRUITS

L'activité de la pectase des fruits a été déterminée de deux manières, soit directement dans les fruits broyés, en suivant la libération du méthanol, soit après extraction de l'enzyme par ClNa M à pH 8,0 en titrant les groupements carboxyles libérés à partir d'un substrat de pectine dans des conditions bien définies selon la méthode indiquée par KERTESZ (1, 11). Les résultats étaient exprimés en milli-équivalents de liaisons ester hydrolysées par minute à 18° C. Les

valeurs obtenues étaient multipliées par 100 000 pour éviter les décimales.

Activité de la Pectase déterminée directement dans les fruits broyés.

Broyer au « mixeur » environ 500 g de fruits et prendre l'heure du broyage comme origine des temps. Prélever des prises d'essai de 25 à 50 g à des intervalles de temps déterminés (tableau 1) et les acidifier par ClH 2N à pH 1. Soumettre le mélange à un entraînement

à la vapeur d'eau, et doser le méthanol dans le distillat. (La méthode nitrochromique de CORDEBARD (12) spécialement étalonnée pour le dosage du méthanol a été utilisée dans ces expériences.)

Le méthanol total libérable à partir des substances pectiques peut être dosé par ailleurs, en traitant une prise d'essai de 25 g par 20 ml de soude N. Après 30 minutes de contact, acidifier à pH 1 et procéder à la distillation et au dosage du méthanol.

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA POLYGALACTURONASE (PECTINASE) ET DE LA PECTINE-DÉPOLYMERASE

Deux méthodes ont été utilisées. Dans la première, les substrats étaient constitués par des solutions tamponnées de pectine ou d'acides pectiques dont on suivait, en fonction du temps, les variations de la viscosité et du pouvoir réducteur. Dans la seconde, utilisée pour l'étude de la solubilisation enzymatique de la protopectine, la solution d'enzymes était mise en contact avec une suspension tamponnée de protopectine brute d'abricot. Les échantillons de protopectine étaient obtenus sous forme de préparations sèches en traitant la fraction des abricots insoluble dans l'alcool à 70 % par l'oxalate d'ammonium à 0,2 % pour éliminer les pectines. Ces préparations renfermaient de 19 à 25 % de protopectine.

a) *Abaissement de la viscosité et augmentation du pouvoir réducteur de solution d'acides pectiques ou de pectines.*

La masse moléculaire moyenne des pectines et la viscosité de leurs solutions sont liées par la relation de STAUDINGER-OWENS (13, 14) :

$$[\eta] = 1,4 \cdot 10^{-6} M^{1,34} \quad (1)$$

dans laquelle M représente la masse moléculaire moyenne de la pectine et $[\eta]$ sa viscosité intrinsèque en solution aqueuse ou limite du rapport de sa viscosité spécifique η_{sp} à la concentration correspondante C en g/100 ml quand C tend vers 0.

Le rapport η_{sp}/C varie en fonction de C selon une loi de la forme (14, 15, 16, 17) :

$$\log \eta_{sp}/C = K \cdot [\eta] \cdot C + \log [\eta] \quad (2)$$

La viscosité spécifique (η_{sp} = viscosité relative au solvant — 1) des pectines en solution aqueuse dépend de la température, du pH et de la teneur en méthoxyles et en cendres de l'échantillon. Différents moyens ont été proposés pour réduire ces effets (14, 16, 17).

Ces mesures de viscosité constituent un moyen commode et sensible pour déterminer l'activité des enzymes pectolytiques (18, 19, 20, 21). Il a été constaté que l'abaissement de la viscosité était proportionnel au logarithme de la concentration de l'enzyme dans le milieu (21, 22) et cette relation est habituellement employée pour exprimer

l'activité pectolytique des préparations enzymatiques. Il est possible, par ailleurs, de calculer l'abaissement de la masse moléculaire correspondant à un certain abaissement de la viscosité et d'en déduire le nombre de liaisons scindées entre les chaînons galacturoniques. Les résultats peuvent être comparés à ceux fournis par des mesures simultanées de l'augmentation du pouvoir réducteur qui indiquent directement le nombre de liaisons scindées, et permettre l'étude cinétique de la réaction.

En appelant P_{no} et P_{nt} les degrés de polymérisation au temps 0 et au temps t d'hydrolyse déduits du pouvoir réducteur, X , le nombre de liaisons scindées du temps 0 au temps t pour une molécule P_{no} , C_0 et C_t le nombre de liaisons susceptibles d'être scindées aux temps 0 et t respectivement,

$X + 1$ sera le nombre de tronçons dans lesquels aura été coupée la molécule P_{no} et nous aurons :

$$X = C_0 - C_x = (P_{no} - 1) - \frac{[(P_{nt} - 1)(x + 1)]}{P_{nt}}$$

$$X = \frac{P_{no} - P_{nt}}{P_{nt}}$$

De même, les mesures de viscosité permettent de calculer des valeurs Pvo et Pvt du degré de polymérisation aux temps 0 et t respectivement et une valeur :

$$X' = \frac{Pvo - Pvt}{Pvt}$$

Mais X et X', calculés à partir de méthodes différentes, ont généralement des valeurs distinctes. Il en est de même pour Pno, Pnt et Pvo, Pvt. Pour rendre les valeurs de X et X' comparatives, elles ont été rapportées à une masse de polyuronide fixée arbitrairement à 100 000. Elles deviennent ainsi :

$$X = \frac{Pno - Pnt}{Pnt} \times \frac{100\ 000}{Mno} \quad (3)$$

$$X' = \frac{Pvo - Pvt}{Pvt} \times \frac{100\ 000}{Mvo} \quad (4)$$

$$\text{ou } X = \frac{Mno - Mnt}{Mnt} \times \frac{100\ 000}{Mno} \quad (5)$$

$$X' = \frac{Mvo - Mvt}{Mvt} \times \frac{100\ 000}{Mvo} \quad (6)$$

en appelant Mno, Mnt, Mvo et Mvt les masses moléculaires correspondant à Pno, Pnt, Pvo et Pvt respectivement.

Les déterminations de X et X' exigent d'opérer les mesures de viscosité et de pouvoir réducteur dans des conditions compatibles avec l'activité des enzymes pectolytiques. De plus, le calcul de $[\eta]$ n'est pas possible puisque les mesures doivent nécessairement être effectuées

à une concentration unique et finie du substrat. Cette difficulté peut être évitée en utilisant comme substrats des pectines ou des acides pectiques dont les constantes K de la formule (2) ont été déterminées et en traçant, à l'aide des formules (1) et (2), des courbes qui permettent de déduire directement M des valeurs de η sp. (tableau 2).

Mode opératoire.

Le mélange en réaction est constitué par une solution de pectine ou d'acide pectique de concentration finale égale à 0,5 % (en acide polygalacturonique) dans un tampon acétique 0,2 M à pH = 4,6.

Avec les pectines, il est possible de faire varier le pH de 3,0 à 7,0 avec les acides pectiques de 4,4 à 7,0. La préparation enzymatique est ajoutée sous la forme d'une solution dans le même tampon et le volume est ajusté à la valeur voulue. Les fioles sont placées dans un bain d'eau réglé à $25^{\circ} \text{C} \pm 0,1$. Une partie du mélange est versé dans le réservoir d'une pipette viscosimétrique type Ostwald (AFNOR — NF — T-60-100, durée d'écoulement pour l'eau : 290 secondes à 25°C) plongée dans le même bain thermostatique. L'heure à laquelle est ajoutée la solution enzymatique est prise comme origine des temps et des mesures des durées d'écoulement sont effectuées en

fonction du temps. Les valeurs correspondantes de η sp, de Mvt sont calculées et la relation (6) permet le calcul de X'.

Les variations du pouvoir réducteur sont déterminées simultanément sur des prises d'essais du même mélange en réaction par la méthode de MacDONNELL et JANSEN (1). 1 ml d'iode N/10 correspond à $0,5 \times 10^{-4}$ liaisons réductrices libérées. Les résultats sont rapportés à une masse de 100 000 g, ce qui donne X.

Les valeurs de X et X' sont directement proportionnelles à la concentration de l'enzyme dans le milieu. Elles peuvent être prises comme mesures de l'activité pectolytique (tableau 2).

b) Solubilisation de substrats de protopectine.

Plusieurs prises d'essais correspondant chacune à 10 mg d'uronide pur sont pesées et mises en suspension après humectation par quelques gouttes d'alcool, dans un tampon acétique M/60 à pH 4,0. Les fioles sont portées dans un bain d'eau réglée à la température de $25^{\circ} \text{C} \pm 0,1$. La solution enzymatique, préparée avec le même tampon, est ajoutée dans chaque fiole. Le volume total de la suspension est ajusté à 30 ml et le mélange est fréquemment agité. Une fiole est prélevée de temps en temps et l'action enzyma-

TABLEAU 2

Abaissement de la viscosité et augmentation du pouvoir réducteur d'une solution d'acide pectique en présence d'une « dépolymérase » de tomate.

| Mesures de viscosité | | | | Mesures du pouvoir réducteur | |
|----------------------|-----------|--------|------|------------------------------|----|
| Temps | η sp | M | X' | Temps | X |
| 0 h. | 0,974 | 31 500 | 0 | 0 h. | 0 |
| 0 h. 11' | 0,694 | 26 000 | 0,67 | | |
| 0 h. 21' | 0,581 | 23 000 | 1,08 | 0 h. 20' | 2 |
| 0 h. 50' | 0,416 | 19 000 | 2,08 | | 12 |
| 1 h. 13' | 0,367 | 17 500 | 2,56 | 1 h. 13' | 26 |
| 2 h. 20' | 0,229 | 12 500 | 4,86 | 2 h. 38' | |
| 3 h. 33' | 0,176 | 10 500 | 6,40 | | |
| 4 h. 42' | 0,142 | 8 500 | 8,64 | 4 h. 23' | 40 |
| Témoin : | | | | | |
| 3 h. 45' | 0,928 | 30 700 | 0,08 | | |

tique est immédiatement interrompue, en ajoutant 60 ml d'alcool à 96 % bouillant. Il est procédé ensuite à l'extraction de différentes fractions de matières pectiques. En plus des trois fractions habituelles (soluble dans l'eau, soluble dans l'oxalate d'ammonium à 0,2 % et soluble dans ClH 0,05 N à 85°C), la fraction soluble dans l'alcool constituée par les uronides de faible poids moléculaire, stade final de la dégradation, peut être recueillie. La fraction soluble dans ClH renferme la protopectine non attaquée. D'autre

part, les deux fractions, solubles dans l'eau et solubles dans l'oxalate, peuvent être groupées en n'effectuant qu'une extraction par l'oxalate, elles représentent le stade intermédiaire de la dégradation.

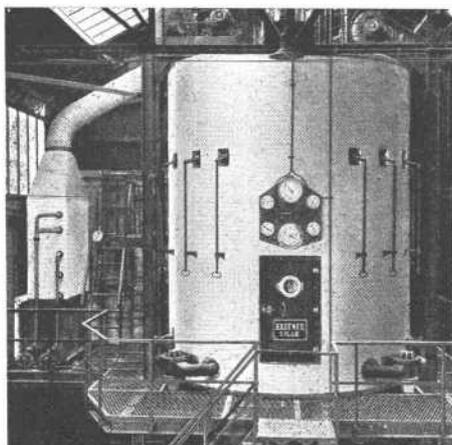
* *

Description des méthodes qui ont été modifiées ou mises au point pour étudier le rôle des matières pectiques et des enzymes pectolytiques dans le maintien de la fermeté des conserves d'abri-

cots. Ces méthodes concernent le dosage colorimétrique, au moyen du carbazol, de différentes fractions de matières pectiques extraites des abricots, la détermination de l'activité de la pectase directement dans les fruits broyés par dosage du méthanol libéré et de l'activité des pectinases et dépolymérasés en suivant soit l'abaissement de la viscosité et l'augmentation du pouvoir réducteur de substrats d'acides pectiques ou de pectines en solutions tamponnées, soit la solubilisation de substrats de protopectine.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) KERTESZ. — The pectic substances (Interscience publish. Inc., New York-London, 1951).
- (2) HAMSON. — *Food Research*, 17, 370 (1952).
- (3) BETTELHELM & STERLING. — *Food Research*, 20, 130 (1955); *id.*, 20, 71 (1955); *id.*, 20, 118 (1955).
- (4) LUH, LEONARD & DEMPSEY. — *Food Research*, 19, 146 (1954).
- (5) OWENS & COL. — Methods used at western research laboratory for extraction and analysis of pectic materials. (Albany, California, June 1952, n° AIC-340.)
- (6) MACCOLLOCH, NIELS & BEAVENS. — *Food Technology*, 4, 339 (1950).
- (7) DIETZ & ROUSE. — *Food Research*, 3, 169 (1953).
- (8) DISCHE. — *J. Biol. Chem.*, 167, 189 (1947).
- (9) DISCHE. — *J. Biol. Chem.*, 183, 489 (1950).
- (10) MACCREADY & MACCOMB. — *Food Technol.*, 22 juin 1953.
- (11) KERTESZ. — *J. Biol. Chem.*, 121, 589 (1937).
- (12) CORDEBARD. — *J. Pharm. Chim.*, 8^e série, 30, 263 (1939).
- (13) STAUDINGER. — Die hochmolekularen organischen Verbindungen. (J. Springer, Berlin, 1952.)
- (14) OWENS, LOTSKAR, SCHULTZ & MACLAY. — *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1628 (1946).
- (15) BAWN. — *Research*, 1, 343 (1948).
- (16) OWENS, LOTSKAR, MERRIL & PETERSON. — *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 1178 (1944).
- (17) SCHMIDT. — *Kolloid*, 121, 151 (1951).
- (18) BEAVEN & BROWN. — *Biochem. J.*, 45, 221 (1949).
- (19) BELLS, ETCHELLES & JONES. — *Food Technol.*, 4, 157 (1950).
- (20) KERTESZ. — *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 2544 (1939).
- (21) REID. — *Food Technol.*, 5, 170 (1951).
- (22) REID. — Intern. Congr. Biochem. Absts of Comm. 1^{er} Congr. Cambridge-England, 287 (1949).
- (23) JOUX. — *C. R. Acad. Agr. France*, 43, 9, 506 (1957).
- (24) JOUX. — *C. R. Acad. Agr. France*, sous presse, séance du 13 novembre 1957.
- (25) JOUX. — Mémoire de thèse pour le diplôme d'ingénieur C. N. A. M. (Chimie Agricole et Biologique), 30 juin 1956. Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris.



— KESTNER —

7, rue de Toul, Lille (Nord) Téléph. : 57-34-60 et la suite.

SÈCHEURS-ATOMISEURS

pour fabrication de poudres de fruits, extraits solubles en poudre, de fruits, café, etc., etc...

ÉVAPORATEURS

pour jus de fruits avec récupération des arômes

Sécheur-Atomiseur