UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

91 INPL 108N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

THESE
Présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'I.N.P.L.

Spécialité
Biotechnologie et Industries Alimentaires

par
Sylvie ROBERT

Sujet

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AUTO-OXYDATION ET DU PROCESSUS DE BRUNISSEMENT DE LA MOUTARDE DE DIJON.

Soutenue publiquement
le 27 Novembre 1991
devant la Commission d'examen

Membres du Jury :

MM.	R. BONALY	Professeur
	G. COSTE	Ingénieur
	J.P. HALUK	Maître de Conférences
	M. METCHE	Professeur
	H. RICHARD	Professeur

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (Institut National Polytechnique de Lorraine), sous la direction de Monsieur le Professeur M. METCHE à qui j'adresse mes plus vifs remerciements pour sa disponibilité et son aide tout au long de cette étude, ainsi que pour les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Je remercie Monsieur R. BONALY, Professeur de Biochimie à la Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Nancy, pour avoir bien voulu apporter son jugement sur ce travail.

Je tiens à témoigner ma gratitude à Monsieur H. RICHARD, Professeur de Chimie Alimentaire à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires de Massy, qui m'a fait l'honneur de venir à Nancy pour porter un jugement critique sur ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Monsieur G. COSTE, Directeur Technique de la Société AMORA, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier Monsieur J.P. HALUK, Maître de Conférences à l'E.N.S.A.I.A., pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je souhaite enfin témoigner ma reconnaissance à la société DUCROS pour l'aide financière, sous forme de bourse, dont elle m'a fait bénéficier, ce qui m'a permis de mener à bon terme cette étude sur la moutarde de Dijon. Mes remerciements vont tout particulièrement à Monsieur J.L. RATEAU, responsable de fabrition, dont les conseils éclairés m'ont été très utiles.

J'adresse également mes "aquenolégements" à Mademoiselle B.PIFFAUT, Messieurs M. GIRARDIN et B.ROVEL pour m'avoir apporté leur aide constante.

Ce mémoire est dédié aux bons petits nains de laboratoire et à tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse, en particulier pour les figures.

Ce mémoire n'est pas dédié aux mauvais petits nains de laboratoire, aux coupures de courant inopinées, aux appareils qui "lachent" quand on a besoin d'eux, bref, tout ce qui fait la joie du travail de laboratoire.

D'une façon générale, ce mémoire est dédié à mes petits camarades du laboratoire avec qui mes relations furent aussi diverses qu'enrichissantes.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

Les Brassicaceae 3
Généralités 3
Utilisation 3
Description botanique 3

Moutarde 6
Espèces botaniques 6
Composition chimique de la graine 7
Fabrication de la moutarde 7
Composition chimique de la pâte 9

Modifications chimiques de la pâte de moutarde au cours de la conservation 9
Importance de l'oxygène dans les mécanismes oxydatifs 10
Brunissement enzymatique 11
Brunissement non enzymatique 16
Dégradation thermique des glucides 16
Cas particulier de l'acide ascorbique 17
Réactions de Maillard 17
Oxydation des lipides 25

Utilisation des antioxydants dans l'industrie alimentaire 28
Propriétés et mécanismes réactionnels 28
Rôle du dioxyde de soufre 31

But du travail 34

MATERIEL 37

I. MATERIEL 39

II. METHODES 39
1. Mesure de la consommation d'oxygène au cours de l'autooxydation de la moutarde 39
1.1. Préparation des échantillons de moutarde 39
1.2. Utilisation de l'Oxygraphe GILSON 39
1.3. Mesure par respirométrie 42

2. Etude des transformations de la pâte de moutarde à l'aide de systèmes modèles 42
2.1. Oxydation par l'oxygène pur, sous pression élevée 42
2.2. Moutarde maintenue sous azote 43

3. Etude des modifications subies par les constituants de la moutarde au cours de l'autooxydation 43
3.1. Dosage des composés réducteurs 43
3.1.1. Dosage des sulfites 43
3.1.2. Dosage de l'acide ascorbique 45
3.1.3. Dosage du NADH 47
3.1.4. Mesure du pouvoir réducteur 48

3.2. Etude de l'oxydation des lipides 50
3.2.1. Identification des acides gras de la pâte de moutarde. 50

3.2.2. Mise en évidence du malonaldéhyde. 52

3.3. Etude de l'oxydation des composés phénoliques..... 53
3.3.1. Extraction des composés phénoliques 53
3.3.2. Dosage des phénols totaux. 55
3.3.3. Identification des phénols et acides phénols..... 56
3.3.3.1. Chromatographie sur couches minces. 56
3.3.3.2. Chromatographie en phase gazeuse..... 56
3.3.3.3. Chromatographie HPLC..... 57

3.4. Etude de l'oxydation des glucides. 58
3.4.1. Dosage de l'acide galacturonique 58
3.4.2. Dosage des sucres libres par chromatographie en phase gazeuse..... 59

3.5. Etude des fractions proteiques..... 61
3.5.1. Dosage des protéines..... 61
3.5.2. Dosage des composés α-aminés..... 62

3.6. Dosage du fer..... 62
3.6.1. Méthode spectrométrique..... 62
3.6.2. Dosage du fer par la bathophénantroline 64

4. Mise en évidence des activités enzymatiques dans la pâte de moutarde. 64
4.1. Extraction des enzymes de la pâte de moutarde. 65
4.2. Mesure de l'activité peroxydasique. 65
4.3. Mesure de l'activité polyphénoloxydasique..... 66
4.4. Mesure de l'activité lipoxygénasique..... 67

5. Etude des produits intermédiaires formés au cours de l'oxydation de la moutarde. 67
5.1. Dosage de H_2O_2 formé dans le milieu au cours de l'oxydation de la moutarde..... 67
5.2. Mise en évidence de la formation de H_2O_2 lors de la réaction catalysée par la peroxydase. 72
5.3. Dosage du furfural et de l'hydroxyméthylfurfural..... 73
5.4. Analyses spectrophotométriques de l'évolution des constituants de la moutarde. 73
5.4.1. Composés hydrosolubles. 73
5.4.2. Composés liposolubles. 73
5.5. Mise en évidence de l'hydroxylation des noyaux phénoliques. 74

RESULTATS-DISCUSSION 77

CHAPITRE 1: Etude de la transformation du dioxyde de soufre. Cinétique et mécanisme d'action dans la moutarde 79

1. ETUDE DU COMPORTEMENT DES SULFITES AJOUTES A LA MOUTARDE..... 81
1.1. Comparaison entre moutarde sulfitée et non sulfitée..... 81
1.2. Addition de sulfite à une moutarde non sulfitée..... 81
1.2.1. Addition au cours de l'autooxydation..... 81
1.2.2. Addition en début de réaction d'autooxydation (Oxygraphe). 83

1.2.3. Addition en début de réaction d'autooxydation (Respiromètre)..... 83
1.2.4. Conclusions..... 86

2. ETUDE DES VOIES D'OXYDATION DES SULFITES..... 90
2.1. Autooxydation de la moutarde sulfitée en présence de catalase..... 90
2.2. Utilisation de systèmes générateurs de peroxyde d'oxygène..... 95
2.3. Moutarde enrichie en peroxyde d'hydrogène..... 97

CHAPITRE 2 : Etude de l'effet de différents additifs en vue de leur utilisation à la place des sulfites dans la moutarde.....103

1. EFFETS DE L'ACIDE ASCORBIQUE SUR L'AUTOOXYDATION DES CONSTITUANTS DE LA MOUTARDE.....106
1.1. Généralités.....106
1.2. Etude de l'autooxydation de l'acide ascorbique.....106
1.2.1. A l'aide de l'Oxygraphe.....106
1.2.2. Mesure au respiromètre.....107
1.3. Etude du devenir de l'acide ascorbique ajouté à la moutarde.....109

2. TOCOPHEROLS.....113
2.1. α-tocophérol.....113
2.2. α-tocophérol en synergie avec l'acide ascorbique.....118

3. COMPOSES PHENOLIQUES.....118
3.1. Etude des propriétés antioxydantes de quelques phénols simples.....118
3.2. Trihydroxybutyrophénone.....124

4 . CHELATANTS DES IONS METALLIQUES.....126
4.1. E D T A.....126
4. 2. Acide urique.....128

5. MANNITOL.....130

6. ACIDES AMINES ET DERIVES.....131
6.1. Cystéine.....131
6.2. Histidine.....136
6.3. Glutathion.....138
6.4 . Produits des réactions de Maillard.....140

7. EXTRAITS VEGETAUX.....142
7.1. Extraits de romarin.....143
7.1.1. Extrait de romarin seul.....143
7.1.2. Extrait de romarin en synergie avec la cystéine.....145
7.2. Extrait de thé vert.....145

8. CONCLUSION.....150

CHAPITRE 3 : Etude de la transformation des constituants de la moutarde au cours de l'auto-oxydation.....151

I. ACTIVITE PEROXYDASIQUE.....153
1.1. Analyse du mécanisme d'oxydation du NADH par la peroxydase.....153
1.1. Généralités.....153

1. 2. Etude, à l'Oxygraphe, de l'oxydation du NADH par la POD de moutarde....155
1. 3. Etude respirométrique de l'oxydation du NADH ajouté à la moutarde....157
1.4. Evolution du pouvoir réducteur, au cours de l'autooxydation d'une moutarde enrichie en NADH,H+....157
1.5. Etude de la formation de H_2O_2 au cours de loxydation du NADH....159

2. Recherche de l'activité peroxydasique....164
2.1. Evolution de l'activité POD au cours de la conservation d'une moutarde sulfitée....164
2.2. Evolution de l'activité POD des moutardes oxydées artificiellement ou maintenues sous azote....166
2.2.1. Activité POD d'une moutarde auto-oxydée à 50°C....166
2.2.2. Activité d'une moutarde oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène....168
2.2.3. Activité d'une moutarde maintenue sous azote à 50°C....170
2.3. Conclusion....170

II. AUTRES ACTIVITES ENZYMATIQUES....172
1. Activité polyphénoloxydasique....172
2. Activité lipoxygénasique....173

III. ETUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE....173
1. Mise en évidence de la transformation des phénols....173
1.1. Extraction et identification des composés phénoliques....174
1.2. Moutarde oxydée sous oxygène....174
1.2.1. Analyse de la fraction "Composés phénoliques libres"....174
1.2.2. Analyse de la fraction "Esters phénoliques solubles".....181
1.3. Moutarde maintenue sous azote....195
1.3.1. Phénols libres....195
1.3.2. Esters phénoliques solubles....196
1.4. Conclusion....197

2. Mise en évidence du processus d'hydroxylation....197
2.1. Autooxydation de la moutarde à 20°C....198
2.2 Autooxydation de la moutarde à 50°C....201

3. Recherche de l'hydroxylation des composés phénoliques....201
4. Conclusion....207

IV. ETUDE DU BRUNISSEMENT NON ENZYMATIQUE....208
1. Etude des pigments solubles dans l'eau....209

2. Etude de la formation des dérivés du furfural....212

3. Evolution du pouvoir réducteur....216

4. Evolution des composés impliqués dans le brunissement non enzymatique....217
4.1. Composés azotés....217
4.1.1. Dérivés a-aminés....217
4.1.2. Protéines....219

4.2. Glucides 219
4.2.1. Oses libres 219
4.2.2. Acide galacturonique 222
5. Conclusion 224

V. ETUDE DE L'OXYDATION DES LIPIDES 225
1. Généralités 225

2. Analyse des pigments liposolubles. 229

3. Oxydation des acides gras 233
3.1. Acides gras libres 233
3.2. Esters d'acides gras 235

V. DOSAGE DU FER 237

VII. CONCLUSION 237

CONCLUSION 243

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 247

ANNEXES 265

INTRODUCTION

Les Brassicaceae

Généralités

Les *Brassicaceae* constituent une famille botanique importante puisqu'elles se répartissent en 4000 espèces et plus de 350 genres. Elles sont essentiellement distribuées en zones tempérées et présentent des intérêts économiques importants.

Utilisation

Les *Brassicaceae* étaient déjà utilisées par les Chinois en 4000 avant J.C. (FENWICK et coll., 1983). Des écrits rapportent aussi leurs utilisations culinaire, médicale ou magique par les Egyptiens et les Romains.

Elles comportent de nombreuses espèces utiles pour l'alimentation humaine : chou (*Brassica oleracea*), navet (*B. napus*), radis (*Raphanus sp.*), cressons (*Nasturtium officinale* et *Lepidium sativum*) ou pour l'alimentation animale, sous forme de fourrages ou de tourteaux d'oléagineux.

D'autres espèces sont utilisées à des fins industrielles. Certaines graines sont employées pour la fabrication d'huiles à usage alimentaire : colza (*B. napus v. oleifera*), navette (*B. rapa v. oleifera*) ; les autres, dont la composition en acides gras toxiques (acide érucique notamment) les rend impropres à l'alimentation humaine, sont, de préférence, réservées aux applications industrielles.

Certaines *Brassicaceae* sont utilisées pour des usages condimentaires et pour leurs propriétés médicinales, sous forme de farine, d'émulsions de moutarde (*Brassica hirta, B. nigra*)(sinapismes) ou de râpure de raifort (*Armoracia lapathifolia*).

Description botanique

Les *Brassicaceae* sont des plantes herbacées, annuelles, à feuilles simples. Les

fleurs sont formées de quatre sépales et de quatre pétales libres, six étamines dont deux petites. Le fruit est une silique (capsule allongée) laissant après la déhiscence une fausse cloison à laquelle les graines sont attachées. Les graines sont le plus souvent sans albumen, elles sont constituées d'un embryon huileux, des cotylédons et des téguments (Figure 1).

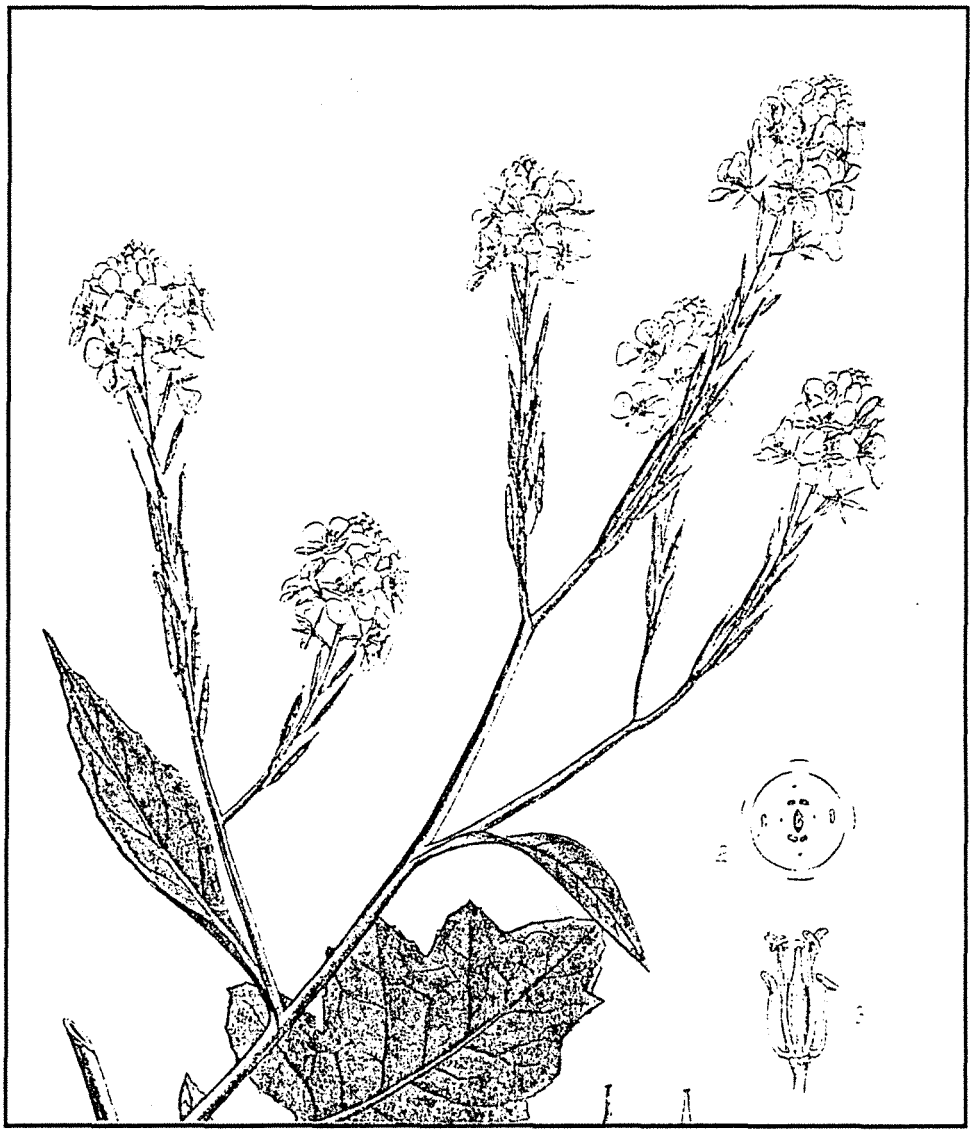
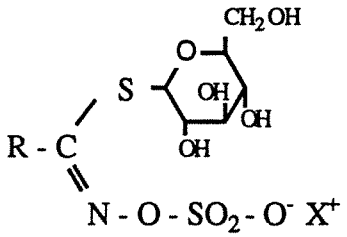


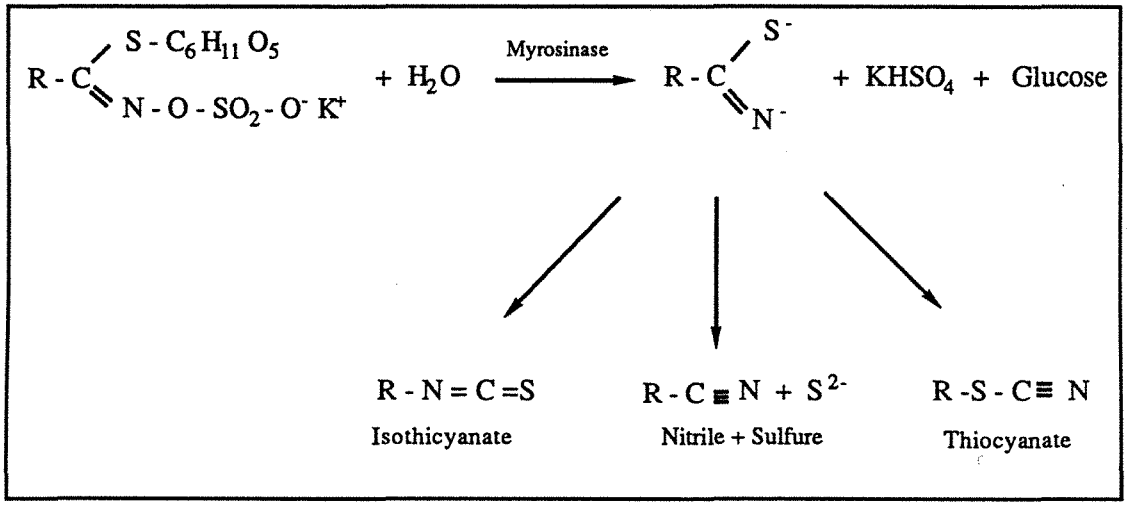
Figure 1 : Moutarde noire (*Brassica nigra*)

Les *Brassicaceae* sont également caractérisées par la présence d'hétérosides soufrés (appelés sénevols) dont les produits de dégradation contribuent à donner au produit une forte flaveur alliacée. La nature et la répartition de ces thioglucosides varient selon la variété botanique et les parties anatomiques de la plante (FENWICK et coll., 1983).

La structure de ces thioglucosides est la suivante :



La famille des *Brassicaceae* est également caractérisée par l'existence d'idioblastes contenant une enzyme, la myrosinase (thioglucoside glucohydrolase : E.C. 3.2.3.1.). Cette glycoprotéine est capable d'hydrolyser les thioglucosides selon l'équation :



La formation de thiocyanates, d'isothiocyanates ou de nitriles dépend des conditions du milieu. Elle peut également s'effectuer par voie non enzymatique, en fonction des conditions de pH et de température et de la présence d'ions métalliques (FRIIS et coll., 1977 ; GRONOWITZ et coll., 1978 ; MAC LEOD et coll.,1987). La désulfuration de l'isothiocyanate en cyanure est aussi influencée par les sels de cuivre, cette réaction a été décrite par VANGHEESDAELE et FOURNIER (1977) comme participant aux phénomènes d'altération des qualités organoleptiques de la pâte de moutarde.

La présence de ces thioglucosides limite l'utilisation des farines (tourteaux), pourtant source importante de protéines, dans l'alimentation animale. L'hydrolyse de ces composés conduit en effet à la libération de dérivés goitrogènes ou toxiques.

Moutarde

Espèces botaniques

Parmi les *Brassicaceae*, les graines des genres *Brassica* et *Sinapis* sont utilisées pour la fabrication de la pâte de moutarde. Le genre *Brassica* comprend plus de cent espèces, trois seulement sont autorisées pour la fabrication du condiment.

Brassica nigra ou moutarde noire est cultivée notamment en Inde. Les graines ont un diamètre de 1 à 1,5 mm et pèsent de 0,14 à 0,17 grammes. Elle contient un thioglucoside : la sinigrine, responsable des propriétés organoleptiques de la moutarde.

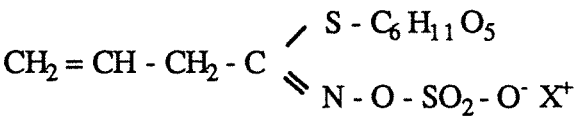


Figure 2 : Structure de la sinigrine

Brassica juncea ou moutarde brune est un hybride de *B. nigra* et de *B. campestris*. Bien que moins riche en sinigrine que *B. nigra*, elle est maintenant la seule utilisée. En effet, elle présente des rendements plus élevés que *B. nigra*, notamment lors de la déhiscence. Cette espèce est largement cultivée dans le monde (Inde, Canada, Hongrie...). La graine a un diamètre de 1 à 2 mm, son poids moyen est de 2,5 mg (VANGHEESDAELE, FOURNIER, 1980)

Les graines de *Sinapis alba* (ou *B. hirta*) ou moutarde blanche ont un diamètre de 2 à 2,5 mm. Le thioglucoside contenu dans cette graine est la sinalbine. Son utilisation est prohibée dans la fabrication de la moutarde forte (Moutarde de Dijon).

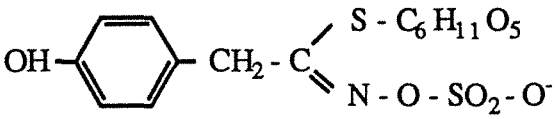


Figure 3 : Structure de la sinalbine

Composition chimique de la graine

Brassica juncea est une graine oléagineuse, les lipides représentent plus de 30% de la graine (VANGHEESDAELE et FOURNIER, 1980 ; LECHNER et KESZTHELYI, 1986). Ils proviennent exclusivement de l'amande. Les protéines font également partie des constituants majeurs avec de l'ordre de 27% du poids sec de la graine.

	Lipides	Protéines	Minéraux	Glucides	Fibres
Sinapis alba	28-36	24-25	4,5-6,5		9,5-12
B. nigra	18-32		4,8-6,9		9-13
B. juncea	38-41,5	26-29	5,5-6,8	4,8-6,2	10-14

Tableau 1 : Composition chimique des principales variétés de graines de moutarde

Fabrication de la moutarde

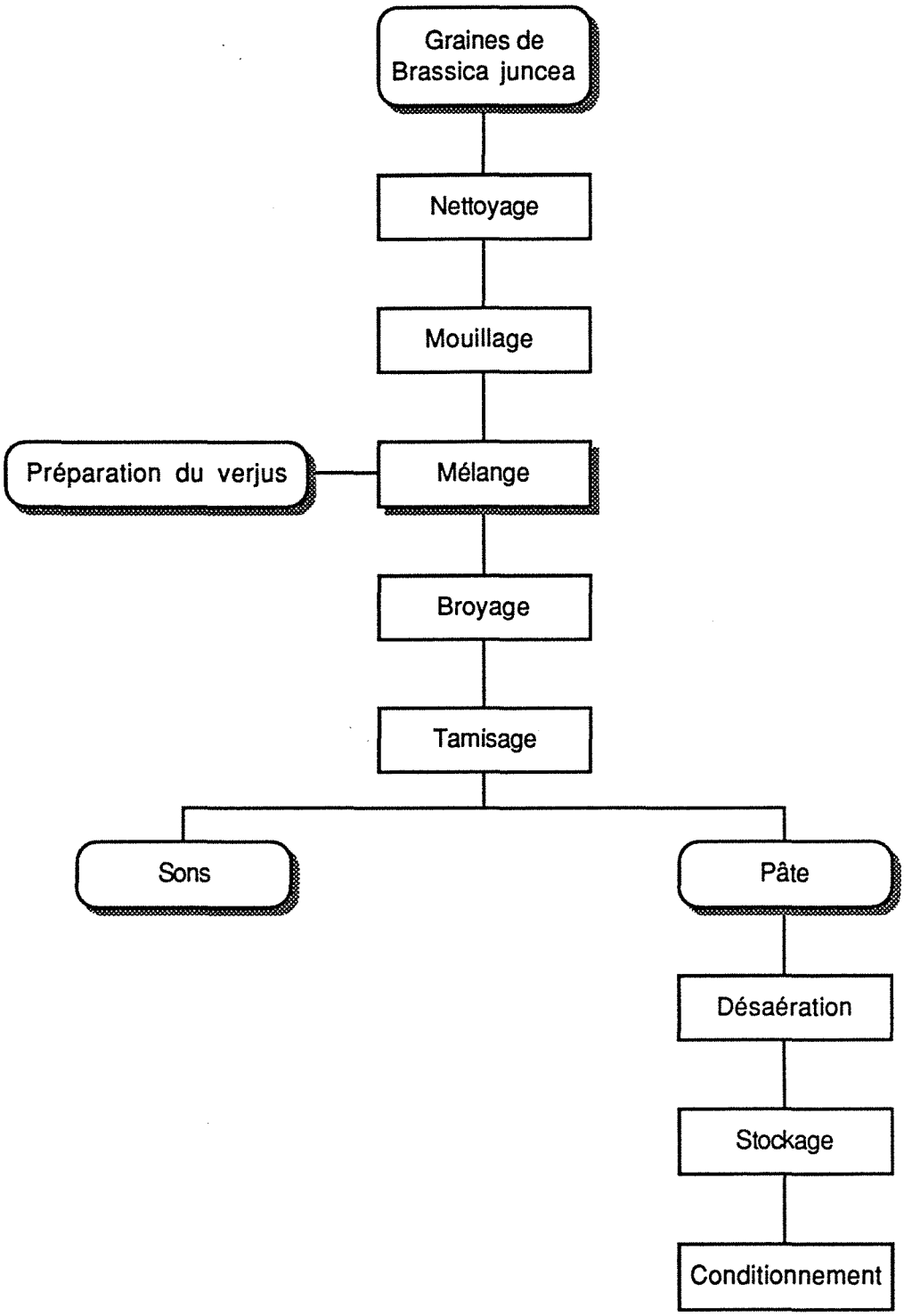
L'ensemble de la graine est utilisé (Figure 4). Les graines sont nettoyées par tamisage puis passage dans un cylindre de dépoussiérage.

Elles sont ensuite mises à tremper dans de l'eau contenant du métabisulfite de sodium. Cette opération permet le gonflement des téguments.

Les graines sont alors mélangées au verjus en proportions soigneusement déterminées. Le verjus était autrefois extrait de raisins cueillis avant maturité ou provenant d'un cépage particulier, à baies acides. C'est maintenant le plus souvent un mélange d'eau, de vinaigre ou de vin et d'anhydride sulfureux. Outre le sel et les aromates, différents additifs peuvent être ajoutés dans le verjus : l'acide tartrique et l'acide citrique, complexants des ions cuivrique et ferreux ; le curcuma, utilisé pour colorer la moutarde. L'anhydride sulfureux est utilisé pour ses propriétés antioxydantes.

Les graines sont broyées à l'aide d'un broyeur à couteaux. C'est cette étape qui permet de mettre en contact la sinigrine et la myrosinase. La réaction enzymatique conduit ainsi à la libération d'isothiocyanate d'allyle (ou allylsénévol), responsable de la flaveur caractéristique de la pâte de moutarde.

Figure 4 : Fabrication de la pâte de moutarde



Le tamisage (ou blutage) permet l'élimination des téguments. La pâte de moutarde est passée à travers des tamis en Inox pour amener sa teneur en son à une valeur inférieure ou au plus égale à 2% (Décret du 10 Septembre 1937).

Afin d'éliminer l'air contenu dans la pâte, source d'oxydation donc d'altération du produit, la moutarde est désaérée par nébulisation dans une enceinte sous vide.

La pâte est entreposée pendant 2 à 4 jours avant le conditionnement. Ce délai favorise la libération de l'essence de moutarde et l'élimination de l'amertume.

Composition chimique de la pâte

Le décret du 10 septembre 1937 fixe également la composition chimique de la pâte de moutarde.

Extrait sec	31 ± 1%
Acidité totale	2,0 ± 0,25°
pH	entre 3,5 et 3,8
Cellulose (téguments)	< 2%
Lipides	10-12%
Glucides totaux	2-6%
Matières azotées	6-8%
Teneur en SO_2	< 50 ppm
Isothiocyanate d'allyle	2 ± 0,2 µg/g
	1,7 ± 0,1 µg/g après un mois

Modifications chimiques de la pâte de moutarde au cours de la conservation.

Les produits alimentaires élaborés sont dépourvus des systèmes de régénération présents dans les organismes vivants dont ils sont issus (animaux ou végétaux). Les altérations dans la composition chimique sont donc pratiquement irréversibles. La composition de la pâte de moutarde n'y fait pas exception.

Différents processus d'oxydation peuvent être observés.

Importance de l'oxygène dans les mécanismes oxydatifs

Plusieurs substances étrangères peuvent être responsables d'altérations des produits alimentaires. L'oxygène atmosphérique est le principal représentant de ce groupe de substances.

Etat triplet

L'oxygène moléculaire est un diradical à l'état triplet. Il se comporte comme un accepteur d'électron : il réagit facilement avec les radicaux libres, les métaux de transition et conduit ainsi à la formation de radicaux peroxydes actifs.

Formes actives de l'oxygène (Figure 5)

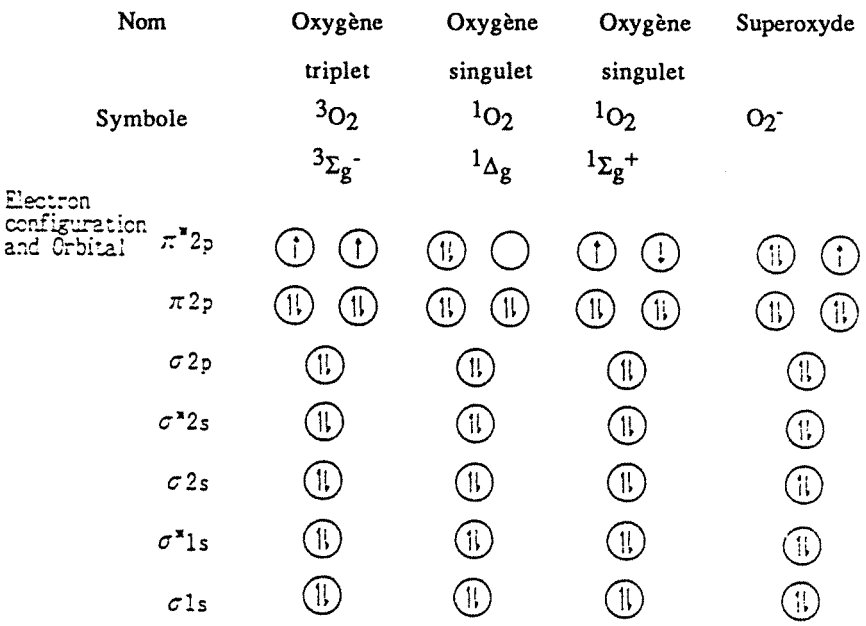


Figure 5 : Configurations électroniques des molécules d'oxygène
(d'après NAMIKI, 1990)

D'autres molécules actives peuvent être générées à partir de l'état triplet, par oxydation ou par réduction (DIGUISEPPI et FRIDOVITCH, 1984).

- La forme activée la plus stable énergétiquement est l'état singulet. Toutefois sa durée de vie est faible. Il est produit principalement par absorption d'énergie lumineuse en

présence de pigments initiateurs tels que les chlorophylles (KHAN, 1978). L'oxygène à l'état singulet réagit avec des composés porteurs de doubles liaisons, acides gras ou phénols en particulier (SLAWINSKA, 1978 ; RABEK et RANBY, 1978).

- Si la quantité d'énergie est suffisante, une molécule d'ozone peut être formée.

- Les radicaux hydroxyl et hydrogène sont très actifs dans les réactions d'oxydo-réduction. Les radicaux hydroxyl peuvent oxyder ou déshydrogéner directement des substances potentiellement oxydables.

Brunissement enzymatique

Dans la graine de moutarde, les activités enzymatiques sont essentiellement présentes dans.les cotylédons, la plus grande partie des enzymes se retrouvera donc dans la pâte.

Les enzymes responsables du brunissement enzymatique sont contenues dans des organelles particulières des cellules végétales. Au cours d'une altération de la plante ou du processus de transformation dans les produits alimentaires (en particulier l'irradiation, le conditionnement sous atmosphère contrôlée, l'entreposage au froid), les enzymes sont mises en contact avec leurs substrats.

Ces réactions de brunissement impliquent les phénols et polyphénols, présents en proportions importantes dans les tissus végétaux.

L'oxydation s'effectue en deux étapes : la première sous l'action de l'enzyme, la seconde de caractère spontané.

Les réactions enzymatiques sont principalement catalysées par la catéchol oxydase (polyphénol oxydase, EC 1.10.3.1) mais d'autres oxygénases peuvent être impliquées, notamment la laccase (EC 1.10.3.2)(MAYER, 1987), la monophénol monooxygénase (tyrosinase, EC 1.14.18.1), la peroxydase (EC 1.11.1.7) et la phénol hydroxylase (phénol 2-monooxygénase EC 1.14.13.7)(VAMOS-VIGYAZO, 1981).

Polyphénol oxydase

Propriétés

Les catéchol oxydases ont des spécificités différentes en fonction de leur origine. En général, les phénolases catalysent deux types de réactions : une hydroxylation (activité crésolase) puis une déshydrogénation (activité catécholase). Dans certains végétaux tels que

le thé (THANARAJ et SESHADRI, 1990), la banane (JAYARAMAN et RAMANUJA, 1987), les phénolases ne disposent que d'une activité catécholase alors que les enzymes de pomme (JANOVITZ-KLAPP et coll., 1990) et d'igname (OZO et CAYGILL, 1986) sont également douées d'une activité crésolase.

La température et le pH optimaux de l'enzyme dépendent de son origine.

Mécanisme de la réaction

Ces enzymes incorporent du cuivre dans leur site actif. Les deux réactions nécessitent la présence d'oxygène moléculaire. Elles s'effectuent selon un mécanisme séquentiel. Récemment, JANOVITZ-KLAPP et coll. (1990) ont démontré l'existence d'un tel mécanisme sur les PPO de pomme sans pouvoir toutefois préciser la nature du premier substrat : oxygène ou phénol.

La réaction conduit à la formation transitoire d'un radical libre OH° ; cette formation s'accompagne d'une modification de la valence du cuivre, au niveau du site actif.

En fonction des composés présents dans le milieu, les quinones issues de la réaction se polymérisent en produits bruns, noirs ou rouges

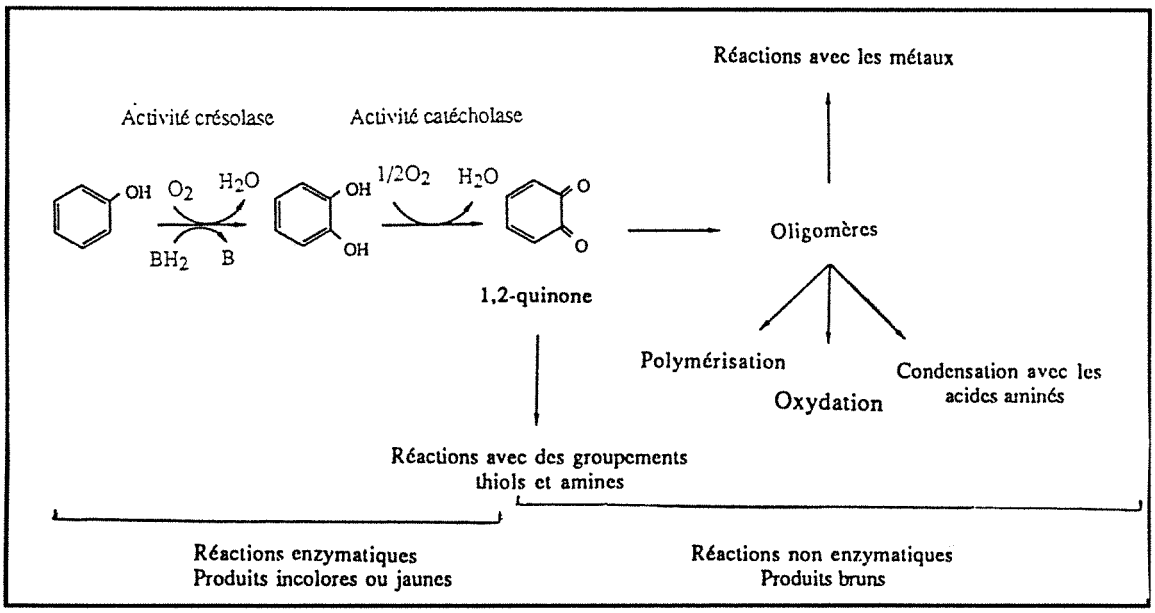


Figure 6 : Réactions de brunissement enzymatique

Peroxydase

Propriétés

Les peroxydases ont été identifiées dans de nombreux végétaux comme intervenant dans le brunissement enzymatique des phénols : pomme de terre (KAHN et coll., 1981), poire (MOULDING et coll., 1989), tomate (EVANS, 1990). Toutefois, le manque de spécificité de ces enzymes ne limite pas leur action aux seuls phénols.

Ces enzymes, largement réparties dans les régnes animaux et végétaux, ont des structures et des spécificités différentes en fonction de leur origine. Les peroxydases d'origine végétale sont des protéines de type héminique. Contrairement aux PPO, elles incorporent un atome de fer dans leur site actif.

Mécanisme réactionnel

L'enzyme présente différentes activités.

La principale est une activité peroxidasique. L'enzyme forme un complexe avec le peroxyde d'hydrogène. Le complexe est alors capable de réagir avec un donneur d'hydrogène (AH).

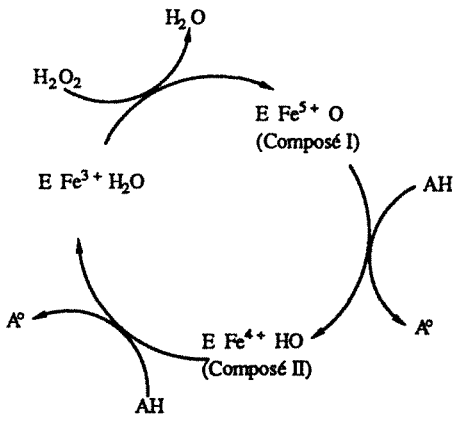


Figure 7 : Mécanisme réactionnel de l'oxydation par la POD.
Changement de valence de l'atome de fer au niveau du site actif.

Les substrats possibles sont nombreux, citons entre autres les phénols. MILLER et SCHREIER (1985) ont décrit la dégradation, par la peroxydase, de flavonoïdes tels que la quercétine (SCHREIER et MILLER, 1985) ou le kaemphérol ; le gaïacol est également utilisé pour la mise en évidence de l'activité peroxydasique. Les amines aromatiques, les acides gras et le NADH (ou NADPH), donneurs d'hydrogène, sont également de bons substrats.

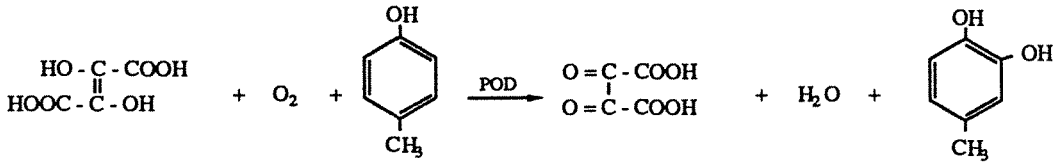
En l'absence de peroxyde d'hydrogène, une activité oxydasique a pu être mise en évidence. La réaction a lieu en présence d'oxygène moléculaire, d'ion Mn^{2+} et d'un phénol. Elle s'effectue via la formation de radicaux libres.

Acide dihydroxyfumarique — Acide dicétosuccinique

En l'absence d'un donneur d'hydrogène, l'oxygène est libéré directement dans le milieu. L'enzyme se comporte alors comme une catalase.

Dans la moutarde ou les produits alimentaires en général, cette activité catalasique est faible en raison de la présence de nombreux accepteurs.

La peroxydase présente enfin une activité d'hydroxylation. Cette réaction permet la transformation de monophénols en orthodiphénols, selon un mécanisme semblable à celui des PPO (KLIBANOV et coll., 1981). En effet, la réaction s'accompagne également de la formation de radicaux libres.



Il est à noter que les mécanismes d'action des deux enzymes, PPO et POD, sont souvent voisins, leur activité s'exerce vis-à-vis de substrats communs, il n'est donc pas surprenant de trouver les deux activités liées sur la même protéine enzyme, comme cela a été récemment mis en évidence dans le soja (TOIGUCHI et coll., 1989).

Dénaturation thermique des enzymes

L'inactivation des enzymes a été envisagée comme un moyen de lutter contre le brunissement enzymatique. Elle est obtenue par différents traitements technologiques : blanchiment, pasteurisation (ADAMS, 1991).

Les polyphénols oxydases sont relativement sensibles au traitement thermique. CANO et coll. (1990) ont par ailleurs montré, sur des PPO de banane, que l'activité résiduelle est influencée par la nature du traitement thermique : micro-ondes, blanchiment ou congélation.

La peroxydase est, elle, beaucoup plus thermorésistante et sert, à ce titre, d'indicateur biologique lors de la stérilisation de certains légumes.

Chez de nombreux végétaux, l'inactivation de la POD s'effectue en deux étapes : une phase rapide et une autre retardée. Les peroxydases, dans ces plantes, sont des isoenzymes dont une fraction est thermosensible, l'autre thermorésistante. Le phénomène a notamment été observé avec les choux ou les légumineuses (RAMANUJA et coll., 1988), les asperges (GANTHAVORN et coll., 1991) ou les tomates (KAHN et coll., 1981).

La régénération de la catalase et de la peroxydase a été étudiée par de nombreux auteurs (GIBRIEL et coll., 1978, KRESHECK et ERMAN, 1988). Ils ont suggéré que l'inactivation de la peroxydase provient d'une dénaturation de la protéine suivie d'une dissociation de l'hématine. La régénération s'effectue par recombinaison de l'apoenzyme renaturée avec l'hématine soluble (TAMURA et MORITA. 1975).

Brunissement non enzymatique.

Dégradation thermique des glucides

La dégradation des sucres dans les produits alimentaires implique un certain nombre de réactions différentes. La majorité des réactions provoque l'apparition de pigments jaunes, bruns ou noirs appelés mélanoïdines, la formation de composés aromatiques et de produits de réaction variés. Les réactions de brunissement non enzymatique impliquent à la fois des réactions propres aux glucides en eux-même mais également leurs interactions avec d'autres constituants des aliments. Ces réactions sont influencées par le pH, la température et l'activité de l'eau (FRANZEN et coll., 1990, OBRETONOV et KUNTCHEVA, 1990, O'BRIEN et MORRISSEY, 1989).

En milieu acide, les glucides subissent différentes transformations. Après des temps relativement longs à température ambiante, des réactions d'isomérisation et de déshydratation ont lieu.

A des températures plus élevées, on observe une hydrolyse des polyosides en monosides puis une déshydratation des oses en désoxyglycosuloses, didésoxyglycosulosènes et 2-furaldéhydes. La déshydratation est la principale réaction en milieu acide fort. Les réactions sont successives et irréversibles. Elles conduisent à la formation d'un constituant principal : le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde, lui même très réactif et partiellement dégradé en acides organiques.

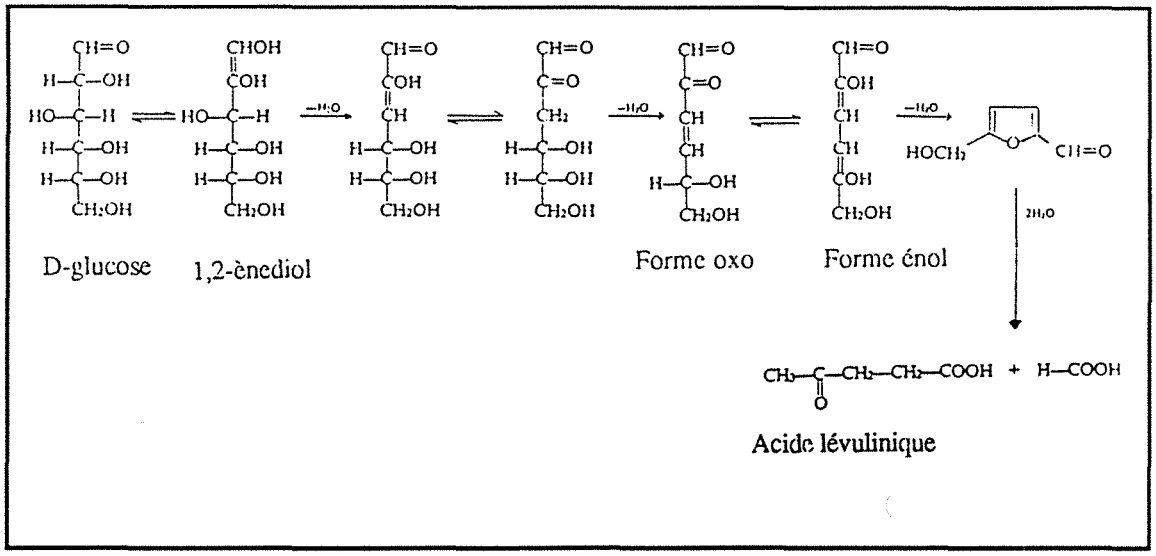


Figure 8 : Décomposition des glucides et formation de HMF

Cas particulier : étude de l'oxydation de l'acide ascorbique.

En présence d'oxygène, l'acide ascorbique est facilement oxydé en acide déhydroascorbique. Les produits obtenus sont moins stables que l'acide ascorbique lui-même. Ils interviennent facilement dans les réactions de brunissement (LÖSCHNER et coll., 1990).

Un autre produit de dégradation : l'acide 2,3 dicétogulonique est hautement réactif et se dégrade rapidement pour former l'hydroxy-5-méthylfurane-2-carbaldéhyde ou la γ- lactone de l'acide thréonique. Ces produits participent eux aussi au brunissement, notamment par la polymérisation de l'acide 2,3 dicétogulonique ou la formation de différentes réductones (KENNEDY, WHITE et coll., 1989)

Les études de LI et coll. (1989), effectuées sur les agrumes, montrent que les produits d'oxydation de l'acide ascorbique participent, de façon plus importante que l'HMF ou le furfural au brunissement.

Les produits d'oxydation de l'acide ascorbique ainsi que l'acide ascorbique lui-même sont capables de réagir avec des dérivés aminés, acides aminés et protéines telles que l'ovalbumine (NISHIMURA et coll., 1989), ils participent ainsi au brunissement non enzymatique, au même titre que les oses (ZIDERMAN et coll., 1989, KENNEDY, RIVERA et coll. 1989)

Réactions de Maillard.

Les réactions de brunissement non enzymatique jouent un rôle important dans la technologie alimentaire puisque non seulement elles provoquent le développement des couleurs caractéristiques de certains produits alimentaires mais également celui de colorations parasites indésirables, la dégradation de la qualité des aliments et la formation possible de substances douées de propriétés antinutritionnelles voire toxiques (O'BRIEN et MORRISSEY 1989).

Ce phénomène implique des réactions non enzymatiques et non oxydatives. Le principal processus, connu sous le nom de réaction de Maillard, met en jeu des composés carbonylés et des amines.

De nombreux articles et ouvrages font état des recherches concernant les réactions de Maillard (ERIKSSON, 1981 ; FUJIMAKI et coll., 1986 ; WALLER et FEATHER, 1983).

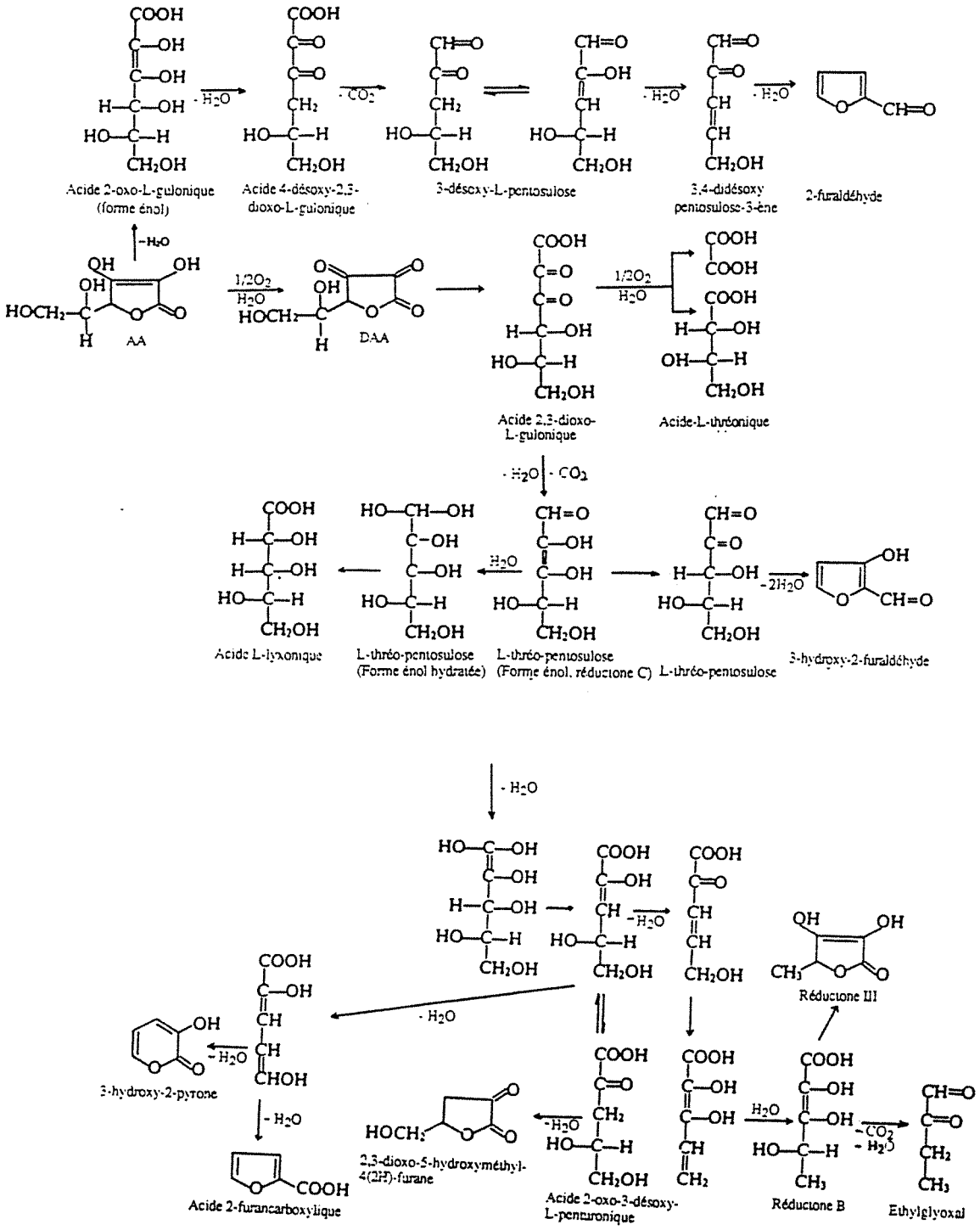


Figure 9 : Décomposition oxydative de l'acide ascorbique.

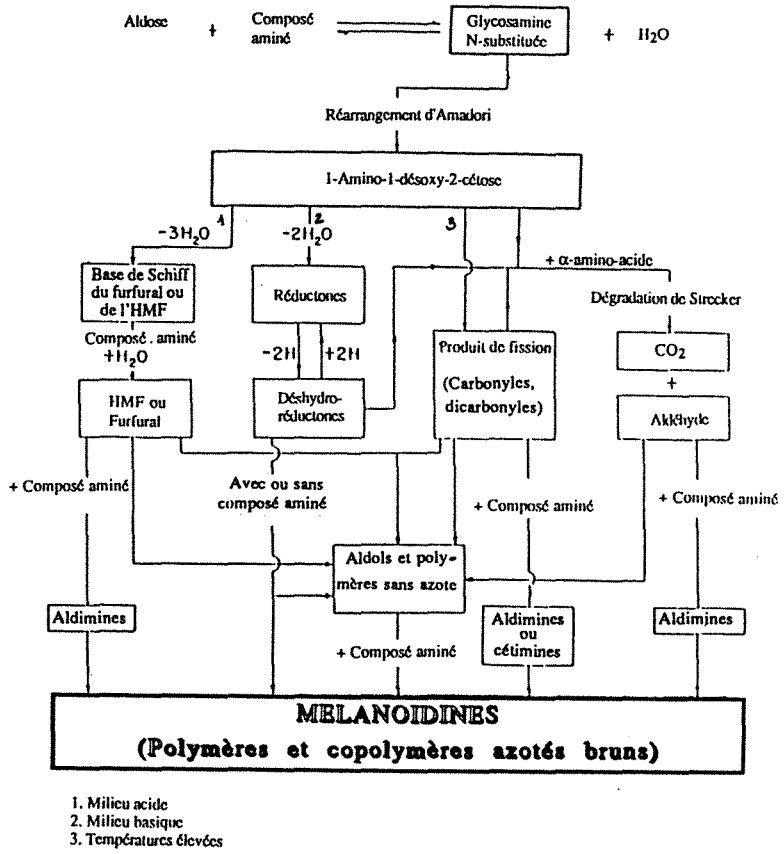


Figure 10 :Schéma d'ensemble de la réaction de Maillard.
(d'après Hodge J. E. Cité par O'Brien et Morrissey 1989)

La réaction peut être décomposée en plusieurs étapes.

Formation de glycosylamines

La première étape de la réaction entre les sucres réducteurs et les composés aminés consiste en une addition de type nucléophile de l'amine sur l'atome de carbone du groupement carbonyle de l'ose correspondant. Les produits sont instables ; ils sont convertis en imines (bases de Schiff) avec perte d'une molécule d'eau ou en composés à chaînes ouvertes (en particulier des réductones) qui peuvent se cycliser en glycosylamines substituées correspondantes (furanoïdes ou pyranoïdes).

Les aldoses réagissent avec l'ammoniaque, les amines primaires et secondaires y compris les acides aminés pour former des aldosylamines.

Comme les aldoses, les cétoses peuvent réagir avec les amines primaires ou secondaires. Les composés formés seront des cétosylamines.

Les réactions sont réversibles, particulièrement en milieu acide.

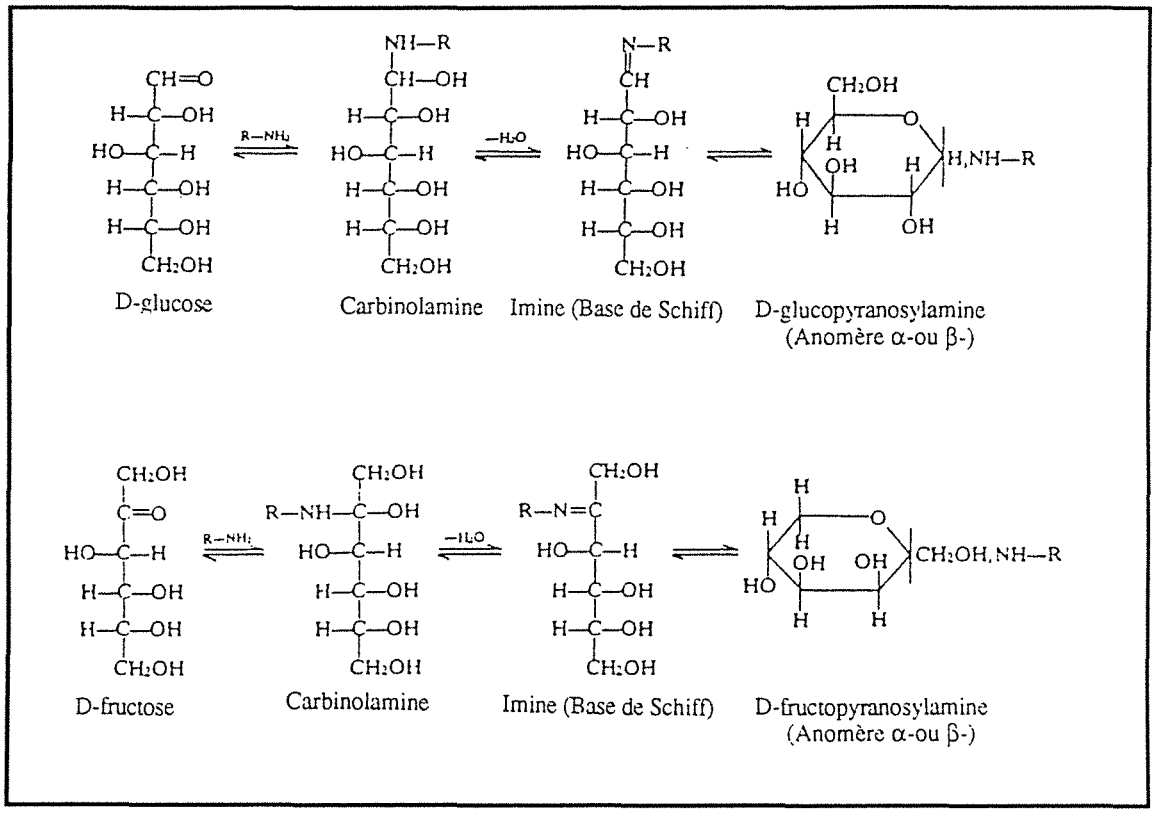


Figure 11 : Réactions des glucides réducteurs avec les amines.

a. Aldoses b. Cétoses

Réarrangement en aminodésoxy oses

En milieu acide, les aldosylamines subissent un réarrangement en cétosamines (isoaldosylamines : 1-amino-1-désoxy-2-cétoses). Cette réaction porte le nom de réarrangement d'Amadori.

Les cétosamines se réarrangent en aldosamines.(2-amino-2-désoxy-1-aldose). La réaction est connue sous le nom de réarrangement de Heyns.

Les produits de ces deux réactions sont doués de fortes propriétés réductrices, supérieures à celles des oses dont ils sont issus.

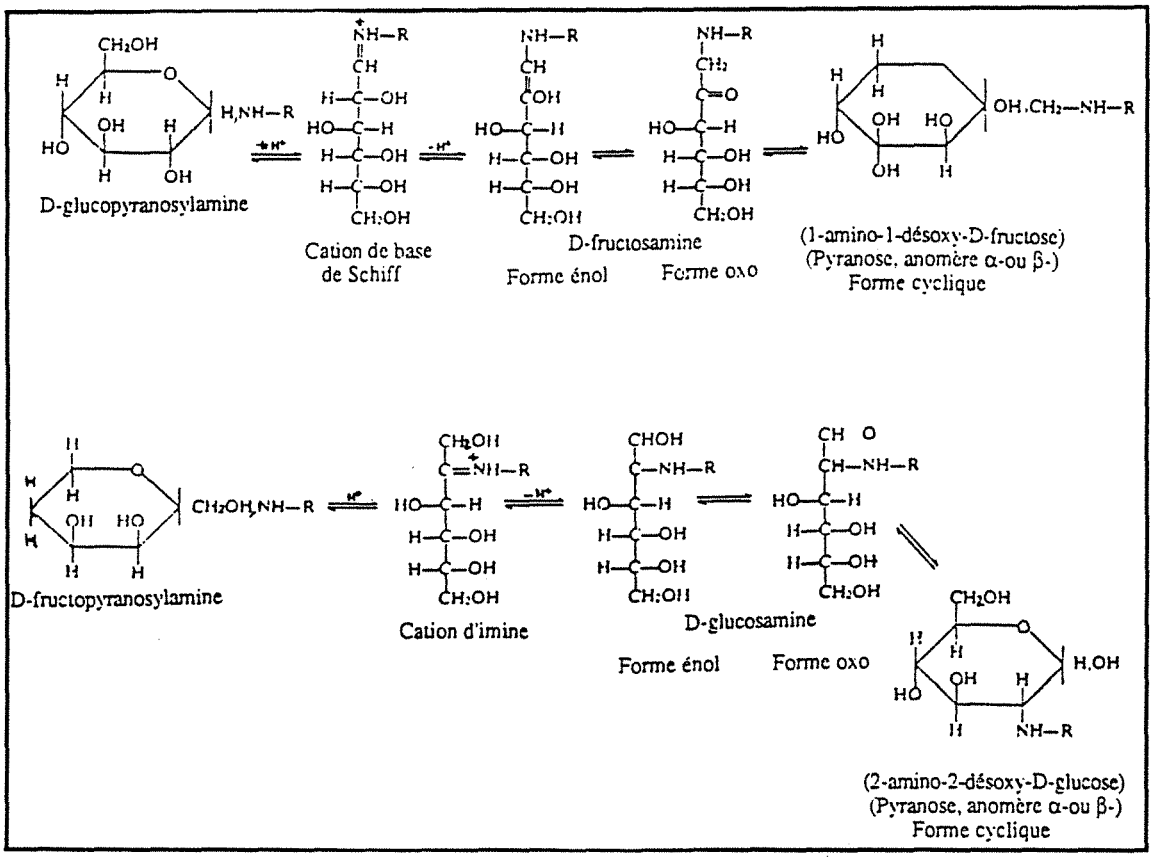


Figure 12: Réarrangement des glycosylamines
a. Réarrangement d'Amadori sur les aldosylamines
b. Réarrangement de Heyns sur les cétosamines

Autres réactions des glycosylamines

Une fraction de la glycosylamine formée peut être scindée en plusieurs fragments au lieu d'être réarrangée en aminodésoxy-ose.

Ainsi, dans le cas de la glucosylamine, la réaction aboutira à la formation de D-erythrose et de glycolaldéhyde imine, hautement réactive (Figure 13). Le clivage est en général immédiatement suivi par la condensation de deux molécules de glycolaldéhyde imine en N-N' dihydropyrazine disubstituée, oxydation qui conduit à la formation de radical pyrazine (NAMIKI et HAYASHI, 1981) et éventuellement à un sel de pyrazolium (SUYAMA et ADACHI, 1986).

Les composés dicarbonylés tels que le glyoxaldéhyde peuvent également être formés directement à partir des glycosylamines. Les radicaux pyrazines peuvent également être issus de la réaction entre des composés dicarbonylés et des dérivés aminés (cystéine, lysine, méthylamine). Dans les systèmes biologiques, cette réaction semble être reliée à un transfert d'électrons par l'intermédiaire de macromolécules biologiques telles que les protéines (GASCOYNE et coll., 1982, 1983)

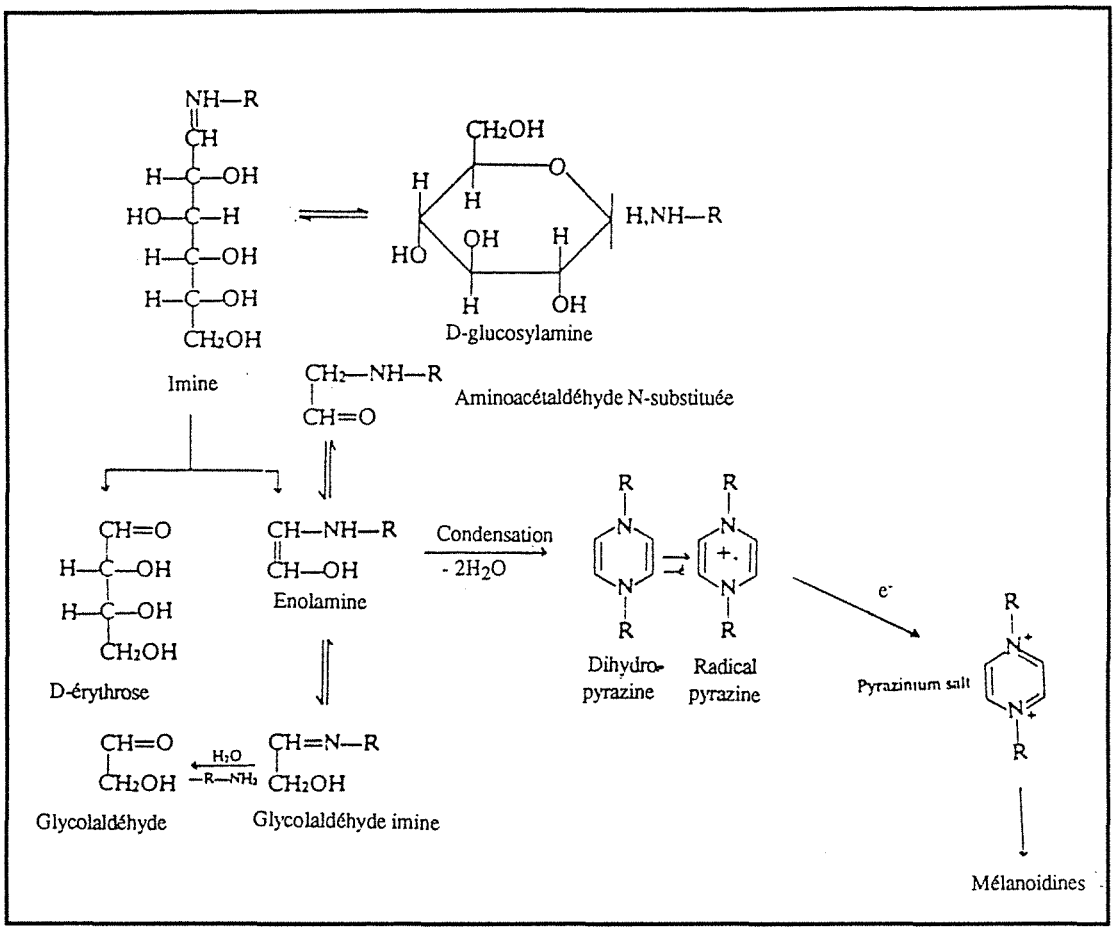


Figure 13 : Mécanisme de scission des glycosylamines. Formation des radicaux pyrazines.

Les imines formées au cours de la première étape de la réaction de Maillard peuvent induire une réaction de transamination qui passe par le réarrangement d'Amadori, conduisant aux composés aminés homologues des alditols.

Réactions des aminodésoxy-oses

La plupart des cétosamines sont stables en solution aqueuse mais se dégradent lentement à pH acide, plus rapidement encore à pH basique. Les aldosamines sont décomposées selon le même mécanisme, donnant ainsi naissance aux cétoses de départ.

En milieu acide, la décomposition des osamines a lieu principalement par l'intermédiaire d'une 1,2-énolisation.

YAYLAYAN et SPORNS (1989) ont également mis en évidence, dans le cas de monocétosamines formées à partir d'un acide aminé tel que la lysine, la manifestation d'une

cyclisation intramoléculaire, à température élevée. Cette cyclisation conduit à la formation d'intermédiaires pyraniques et de produits de fragmentation des oses.

Réactions des produits de dégradation des sucres avec des composés aminés.

De nombreux composés α-dicarbonylés sont formés au cours de cette ensemble de réactions complexes. Ils réagissent aisément avec les composés aminés. Ce processus connu sous le nom de dégradation de Strecker conduit à la libération d'aldéhydes et de CO_2 dans le milieu réactionnel, provoquant ainsi le développement de substances aromatiques.

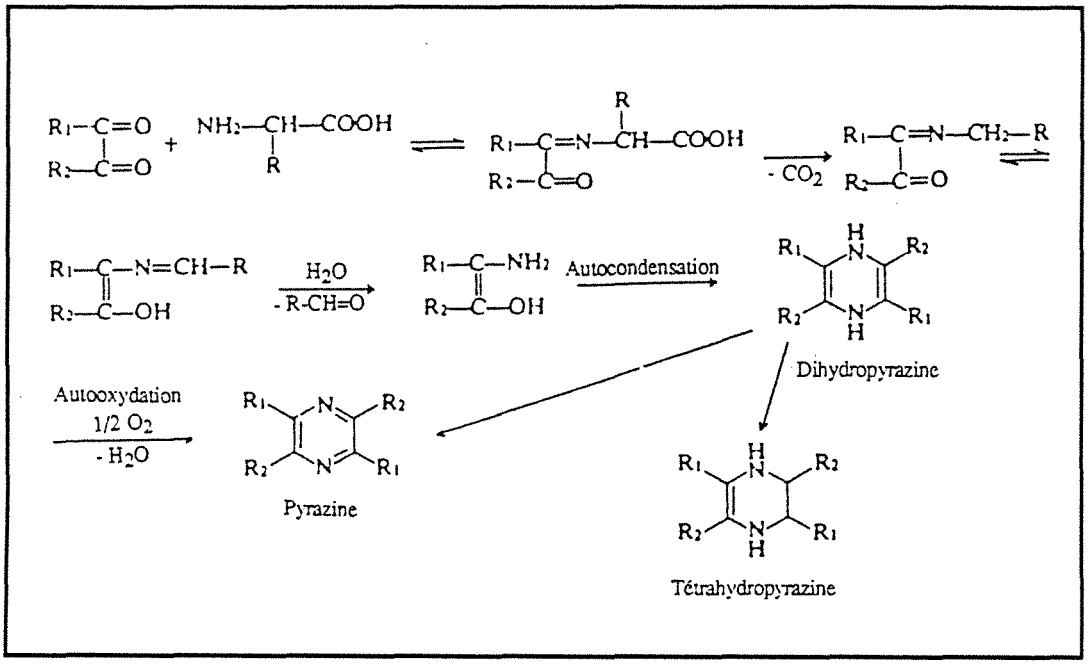


Figure 14 : Mécanisme de formation des pyrazines à partir des composés α-dicarbonylés.

Ces réactions aboutissent en outre à la formation de nombreux produits, ainsi MILLIE et PILETIE (1984) ont pu identifier 7 pyrroles, 30 pyrazines et une pyridine au cours du traitement thermique d'un système modèle contenant du D-glucose et un acide aminobutyrique. Ces composés sont souvent, eux aussi, doués de propriétés odorantes.

Toutefois, les pyrazines ne sont pas formés uniquement par cette voie, ainsi YUAN et coll. (1989), ont pu mettre en évidence la formation de 1,4-dihydropyrazine à partir d'un intermédiaire dont les atomes d'azote ne sont pas substitués par la chaîne latérale de l'acide aminé de départ.

Mélanoïdines

La réactivité des oses participant à la formation des produits bruns est variable. Ainsi le ribose est le plus réactif alors que le saccharose l'est beaucoup moins.

Les mélanoïdines apparaissent comme un ensemble de composés de différents poids moléculaires (supérieurs à 1000), relativement inertes à la fois chimiquement et physiquement et qui présentent des propriétés de solubilité, de couleur, et d'effet antioxydant différentes. Les mélanoïdines contiennent de l'azote, elles manifestent également un caractère acide, en raison de la présence de groupements hydroxyles et carboxyles.

En technologie alimentaire, les propriétés antioxydantes des mélanoïdines sont intéressantes (YAMAGUCHI, 1986). Ces propriétés dépendent du système acide aminé-ose utilisé ; certaines fractions des mélanoïdines ont, au contraire, des propriétés prooxydantes.

Aspects nutritionnels et toxicologiques

Les réactions de condensation entraînent une dégradation des aminoacides. Les conséquences nutritionnelles sont importantes quand les réactions impliquent des acides aminés essentiels, la lysine en particulier. Les associations glucides-aminoacides contribuent également, au niveau moléculaire, à une diminution de la digestibilité des protéines.

Le brunissement non enzymatique constitue aussi une cause importante de la destruction de l'acide ascorbique dans les aliments. Les réactions de Maillard conduisent à la formation de composés toxiques et antinutritionnels (O'BRIEN et MORRISSEY, 1989). Des dérivés cytotoxiques ou cancérogènes ont notamment été identifiés (GRIVAS et coll., 1986 ; DEN DRIJVER et coll., 1986 ; OMURA et coll., 1983). La nitrosation des produits des réactions de Maillard est également une source de composés cancérogènes (YEN et LEE, 1986 ; LYNCH et coll., 1983).

Ajoutons que le brunissement non enzymatique ne se limite pas aux produits alimentaires puisque les protéines peuvent également être modifiées par cette voie, *in vivo*. Ainsi, ces réactions contribuent au développement de la cataracte (par glycosylation des protéines du cristallin) et au vieillissement du collagène et de l'élastine (MONNIER et CERAMI, 1983)

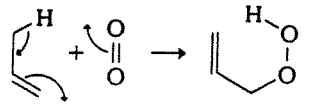
Oxydation des lipides

En raison de sa richesse en lipides, la pâte de moutarde peut faire l'objet d'autooxydation. Ce sont essentiellement les acides gras insaturés qui servent de substrats à l'action de l'oxygène moléculaire pour donner des produits de rancissement qui nuisent aux qualités organoleptiques de la moutarde.

Plusieurs mécanismes d'oxydation sont possibles, presque tous conduisent à la formation transitoire d'hydroperoxydes.

Oxydation par l'oxygène "activé"

Les lipides peuvent être oxydés par certaines formes actives de l'oxygène telle que l'oxygène singulet (TERAO et MATSUSHITA, 1981 ; LARSON et HUNT, 1978). La réaction implique la participation des lipides insaturés.



Acide gras monoinsaturé — Hydroperoxyde

Figure 12 : Mécanisme d'oxydation des acides gras insaturés par l'oxygène singulet.

L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres $O_2^{-}°$, $HO_2°$, HO° (SVINGEN et coll., 1978) participent également aux réactions d'oxydation des lipides, notamment en présence de cations métalliques (Cu^{2+}, Fe^{2+}). D'autre part, ces cations oxydent directement les lipides par voie radicalaire.

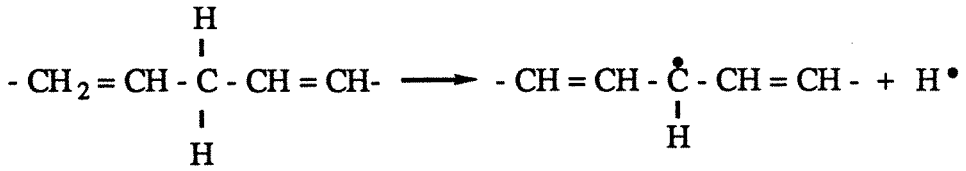
$$RH + Cu^{2+} \longrightarrow Cu^{+} + R° + H^{+}$$

Cette réaction bien que se déroulant à faible vitesse, donc quantitativement peu importante, joue un rôle non négligeable dans le processus d'initiation des réactions radicalaires en chaîne.

Autooxydation des lipides insaturés

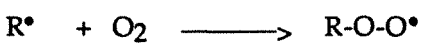
Il s'agit d'une réaction radicalaire qui se déroule à température ambiante.

Au cours de la phase d'initiation, un acide gras (R-H) est transformé en radical libre. La réaction affecte les groupements -CH_2- dont la résistance de la liaison est diminuée par la présence d'une double liaison en position vicinale.



La réaction est initiée par un radical libre.

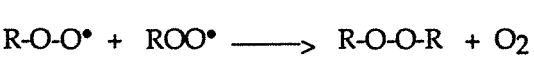
Le radical R° réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde :



Le radical hydroperoxyde formé réagit avec une autre molécule d'acide gras.

Les deux réactions permettent l'accumulation d'hydroperoxydes pendant la phase de propagation.

Au cours de la phase de terminaison, les intermédiaires se condensent selon différentes réactions :

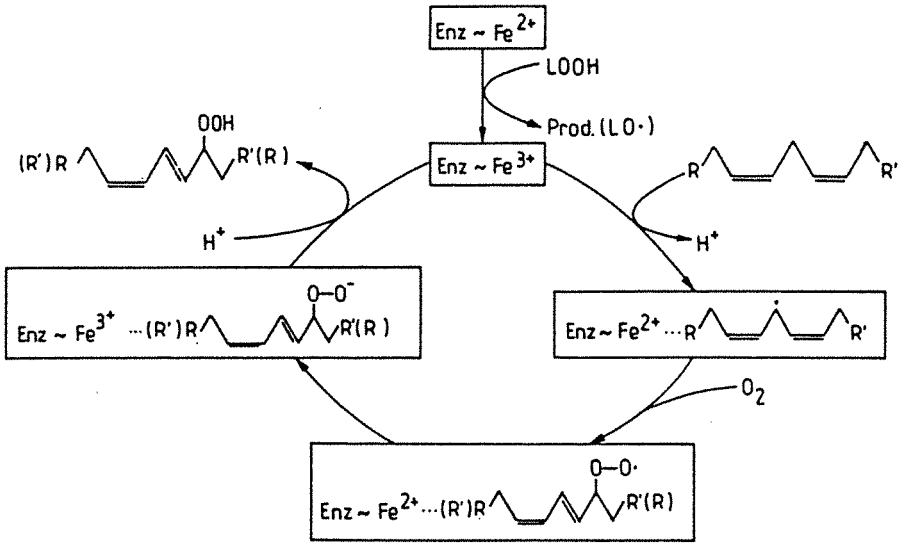


<u>Réactions enzymatiques</u>

La dégradation enzymatique des lipides fait essentiellement appel à l'action de la lipoxygénase. Différentes isoenzymes ont été identifiées dans certains végétaux. La lipoxygénase est particulièrement présente dans les graines oléagineuses. L'action de cette enzyme s'exerce sur les acides gras insaturés de structure cis, cis-pentadiène,1-4 (HELLWING et coll., 1990) :

$$R - CH = CH - CH_2 - CH = CH - R'$$

Le site actif de la lipoxygénase contient un atome de fer (Fe^{3+}) qui contribue à l'oxydation du pentadiène. En aérobiose, la réaction de dioxygénation de l'acide gras insaturé peut être schématisée par :



On observe des spécificités différentes vis-à-vis du substrat selon son origine (GARDNER, 1975).

La β-oxydation est une voie de dégradation des lipides bien connue. Elle est catalysée par l'acyl-CoA transacylase. La réaction conduit à des composés de faible poids moléculaire, souvent volatils, tels que les acétates, les hexanoates, les méthylcétones. Ces produits de dégradation interviennent dans l'élaboration des arômes des fruits.

Décomposition des hydroperoxydes

Un grande quantité d'hydroperoxydes s'accumule. En eux-même, ils ne modifient pas les propriétés organoleptiques des produits oxydés. En revanche, ils sont facilement transformés en produits rances, à odeur désagréable et parfois toxiques.

Des époxydes peuvent être formés. Leur décomposition entraîne l'apparition d'aldéhydes, responsables des modifications sensorielles des lipides oxydés.

Réactivité des acides gras oxydés

Les produits provenant de l'oxydation des lipides (dérivés carbonylés) réagissent aisement avec les fonctions amines : protéines, acides aminés pour former des composés colorés en brun (POKORNY, 1981)

Utilisation des antioxydants dans l'industrie alimentaire.

Afin de limiter voire d'éliminer les effets néfastes de l'oxydation sur les produits alimentaires, différents procédés sont utilisés. Il s'agit par exemple de méthodes mécaniques ou physiques telles que la désaération et le blanchiment. Différents antioxygènes sont également utilisés. Chaque classe de ces composés chimiques doit répondre de façon appropriée à un type d'oxydation donné.

C'est la raison pour laquelle on peut distinguer :

- les inhibiteurs de la catalyse enzymatique ou non enzymatique.

- ceux qui agissent en bloquant les substrats des réactions. Ces substrats sont essentiellement des lipides insaturés ou des composés phénoliques.

- les substances qui agissent spécifiquement sur l'oxygène et ses formes activées : les antioxygènes au sens strict.

Il convient toutefois de rappeler que certaines de ces substances agissent selon plusieurs mécanismes. L'efficacité d'un même produit est souvent différente selon la nature du milieu.

Certains aliments sont naturellement pourvus d'antioxydant, ils assurent ainsi une protection suffisante du produit contre l'autooxydation. D'autres aliments, en revanche, nécessitent un apport complémentaire en antioxygène afin d'obtenir une protection efficace contre les altérations. Ces antioxydants peuvent être d'origine naturelle ou synthétique.

Propriétés et mécanismes réactionnels

Antioxygènes.

Les pièges à radicaux libres

Ils sont capables de céder facilement un atome d'hydrogène (H°) à un radical libre, formant ainsi un radical plus stable que le radical initial. La propagation des réactions radicalaires est bloquée.

Largement utilisés dans l'industrie alimentaire, ils agissent notamment sur les radicaux hydroperoxydes, issus de l'oxydation des lipides, ainsi que sur les radicaux oxygénés actifs : OH°, $O_2^{-\circ}$.

$$ROO^\circ + AH \longrightarrow ROOH + A^\circ$$

Les composés phénoliques agissent selon ce mécanisme. Ils sont présents dans un certain nombre de composés végétaux, qu'ils protègent ainsi contre l'autooxydation. Les tocophérols, ou les extraits phénoliques de sésame (FUKUDA et coll., 1985), de riz (OSAWA et coll., 1985 ; RAMARATHNAM et coll., 1989) ou de différentes épices sont utilisés pour ces propriétés.

Des antioxygènes d'origine synthétique sont également employés au cours de la fabrication des produits alimentaires, citons notamment le BHA, le BHT, le TBHQ et les esters de l'acide gallique, en particulier le gallate de propyle.

Ces inhibiteurs des réactions radicalaires ne protègent efficacement que les produits alimentaires dans lesquels l'oxydation est peu avancée. Leur transformation limite également leur action dans le temps. Leur durée d'action peut toutefois être prolongée en ajoutant dans le milieu réactionnel des composés qui agissent en synergie avec les inhibiteurs des réactions radicalaires.

Capteurs d'oxygène

Ces composés sont des réducteurs qui, en s'autooxydant, piègent l'oxygène contenu dans le milieu. Ils participent à un cycle redox qui conduit à la régénération des pièges à radicaux libres.

L'acide ascorbique doit être utilisé avec prudence : son efficacité dépend en grande partie de la nature du milieu auquel il est ajouté. Le palmitate d'ascorbyle, les sulfites et l'acide érythorbique agissent selon ce mécanisme.

Glucose-oxydase

La glucose oxydase est utilisée pour éliminer l'oxygène, en présence de glucose. Le peroxyde d'hydrogène formé est dégradé par la catalase.

La législation française n'autorise pas son utilisation dans les produits alimentaires. Cette enzyme est toutefois utilisée dans certains pays comme inhibiteur du brunissement dans les boissons (SCHOBINGER et coll., 1989) ou les produits avicoles. JIANG et OORAIKUL (1989) ont étudié l'efficacité de cette enzyme pour inhiber le brunissement non enzymatique dans les produits à base de pomme de terre.

Inhibitions des réactions de brunissement enzymatique et non enzymatique

Acidifiants

Ils protègent contre l'oxydation en modifiant la vitesse de réaction des oxydoréductases. Les plus couramment utilisés sont les acides lactique, citraconique, fumarique, tartrique, le jus de citron ou le vinaigre.

Certains de ces composés exercent en outre leur action en chélatant les cations métalliques. Cet effet est toutefois souvent incompatible avec l'acidification, puisque, dans ces conditions, les groupements carboxyliques ne sont pas pleinement dissociés.

Protéases

Récemment, TAOUKIS et coll. (1988) ont montré que certaines protéines de fruits et principalement la ficine, protéase extraite du figuier, inhibe le brunissement des fruits et la mélanose chez les crustacés. Cette propriété n'est pas affectée par le traitement thermique. D'autres protéines de fruits sont également connues pour leur activité protéasique, notamment l'actinidine, extraite du kiwi (*Actinidia* sp.) ou la papaïne.

Chélateurs des cations métalliques.

Les cations métalliques participent activement aux réactions d'oxydation. De nombreux composés possédent des propriétés chélatantes vis-à-vis de ces ions. Les plus couramment utilisés sont l'EDTA, les phosphates, l'acide citrique. Les flavonoïdes, l'acide ascorbique ainsi que certaines protéines soufrées sont également capables de chélater les cations.

L'utilisation de l'EDTA est cependant discutée, en raison de sa toxicité d'une part, et des réactions de prooxydation qu'il provoque par ailleurs (GRAF et coll., 1984; KOPPENOL, 1985), d'autre part.

Antioxydants agissant en bloquant les substrats des réactions.

LEE et coll. (1990) et OSZMIANSKI & LEE (1990) ont également trouvé dans le miel une protéine qui inhibe le brunissement dans les jus de fruits et les fruits coupés. La protéine semble agir en se complexant aux tanins.

Rôle du dioxyde de soufre

L'usage du SO_2 pour ses qualités hygiéniques est connu depuis l'Antiquité. Le dioxyde de soufre et ses dérivés sont utilisés dans l'industrie alimentaire, notamment en oenologie. Ils sont incorporés lors de la fabrication de la pâte de moutarde.

Structure

Le terme de sulfites est appliqué à des composés inorganiques susceptibles de libérer du dioxyde de soufre dans certaines conditions. Différentes espèces chimiques sont autorisées (E 224) notamment le dioxyde de soufre sous forme gazeuse, le métabisulfite de sodium ($Na_2S_2O_5$), le sulfite de sodium (Na_2SO_3), l'hydrogénosulfite de sodium ($NaHSO_3$).

En raison des modifications organoleptiques que le dioxyde de soufre peut occasionner à trop fortes concentrations, son emploi est limité. Ainsi dans la moutarde, la législation française limite l'apport en sulfite à 50 mg pour 100 g de pâte.

Utilisation-Mode d'action

Les sulfites sont ajoutés dans les produits alimentaires pour contrôler notamment le brunissement enzymatique et le brunissement non enzymatique, mais aussi pour leurs qualités bactéricides, leurs propriétés réductrices et antioxydantes et comme agents de blanchiment. Les sulfites réagissent rapidement avec différents constituants des produits alimentaires. La proportion de SO_2 libre est faible.

La réactivité de ces antioxydants est liée à la présence dans la molécule d'une paire d'électrons libres. Cette particularité confère au dioxyde de soufre la capacité de réagir avec des intermédiaires carbonylés au moyen d'une attaque nucléophile (WEDZICHA, 1986).

Inhibition du brunissement non enzymatique

L'efficacité des sulfites dans le contrôle du brunissement non enzymatique réside sans doute dans leur capacité d'agir sur différentes voies et sur différentes étapes de cet ensemble de réactions. En effet, cette action s'exerce sur les produits de départ de la réaction (oses), sur les produits intermédiaires comme sur les mélanoïdines. Les sulfites, en formant des produits d'additions avec les composés intervenant dans les réactions de Maillard bloquent l'apparition de produits bruns. WEDZICHA et coll. (1984) ont développé un modèle cinétique d'inhibition du brunissement non enzymatique par les sulfites.

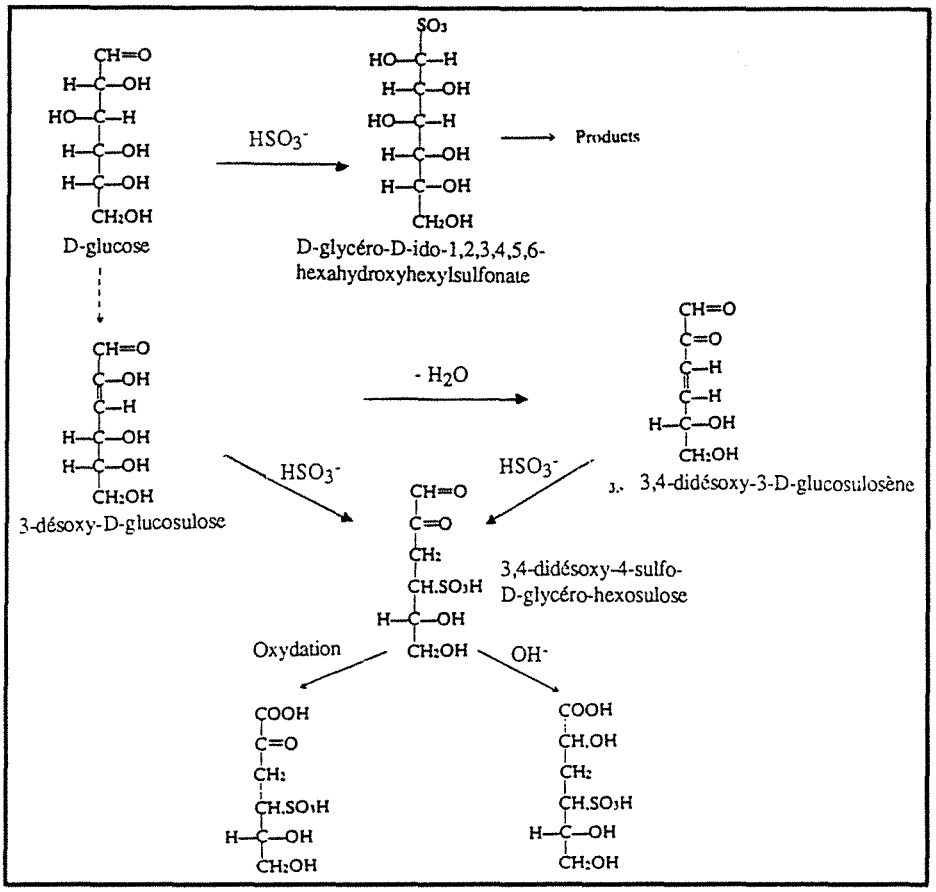


Figure 17 : Réaction des sulfites avec le glucose
Formation d'hydroxysulfonate (WEDZICHA, 1981)

Le dioxyde de soufre réagit avec les composés carbonylés pour former des hydroxysulfonates (Figure 17). Le 3-désoxy hexosulose est un intermédiaire quantitativement important et très réactif de la réaction de condensation entre le glucose et la glycine. L'attaque par SO_2 conduit à la formation de 3-désoxy 4-sulfohexosulose (McWEENY, 1981 ; McWEENY et coll., 1974) ou au 3,4-didésoxy-4-sulfohexosulose (WEDZICHA et GARNER, 1991).

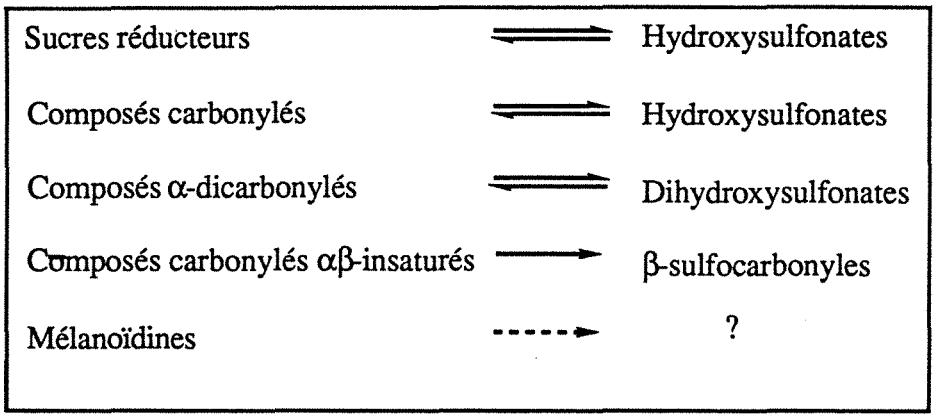


Figure 18 : Schéma général des effets de SO_2 sur les réactions de Maillard (d'après MAC WEENY, 1981)

Inhibition du brunissement enzymatique

L'action du dioxyde de soufre sur le brunissement enzymatique a été décrite par SAYAVEDRA SOTO (1984) dans le cas de la polyphénol oxydase.

La thiamine, cofacteur de certaines enzymes, est particulièrement sensible à l'action du dioxyde de soufre. Les conséquences nutritionnelles sont importantes (WEDZICHA, 1981).

Le dioxyde de soufre est également capable de modifier les liaisons disulfure dans la structure secondaire des protéines. Cette réaction semble essentiellement affecter les propriétés fonctionnelles des protéines (pouvoir moussant notamment). Cependant, l'action inhibitrice du dioxyde de soufre se traduit par une inhibition de l'activité oxydasique et des réactions de brunissement qui s'ensuivent.

Selon HAISMAN (1974), l'effet des sulfites dans l'inhibition de ces réactions dépend de la concentration utilisée. A fortes concentrations, c'est l'inactivation des enzymes qui prédomine. Pour des doses plus faibles, cette action se manifeste essentiellement sur les quinones issues de la réaction.

Toutefois, l'inhibition des activités enzymatiques par les sulfites ne présente pas que des intérêts dans la pâte de moutarde. Ainsi, DIAHAM (1983) a montré que ces antioxydants agissent également sur la myrosinase. La quantité d'isothiocyanate d'allyle produite est diminuée.

Il existe un autre mode d'action des sulfites sur l'arôme de la moutarde. En effet, l'isothiocyanate d'allyle réagit de façon irréversible avec les sulfites pour former de dérivés de l'aminothiométhanesulfonate (SANKARAN et NARASHIMA RAO, 1977).

$$S = C = N - CH_2 - CH = CH_2 \quad + \quad HSO_3^- \longrightarrow \quad S = C(SO_3^-) - NH - CH_2 - CH = CH_2$$

Les composés formés ne sont pas volatils et présentent une flaveur alliacée. C'est cette réaction qui conduit, selon FRIJTERS et coll. (1981) à une diminution de la teneur en isothiocyanate d'allyle et donc à une diminution des qualités organoleptiques de la moutarde. SAUVAGEOT et coll. (1985) ont observé la même réaction de condensation dans la moutarde sulfitée, sans toutefois pouvoir lui attribuer une action dans la modification du caractère piquant de la pâte.

D'autre part, certaines études rapportent l'existence de phénomènes allergiques liés à l'absorption de cet antioxydant, phénomènes allergiques pouvant conduire à une induction de l'asthme chez les sujets sensibles (BAKER et ALLEN, 1982 ; Congressional Hearing on Sulfites 1985 ; TAYLOR et coll. 1986 ; WALKER, 1985). Les réactions allergiques deviennent nulles quand le dioxyde de soufre est engagé dans des liaisons avec les constituants alimentaires. De nombreuses recherches vont donc dans le sens d'un remplacement de cet additif dans les produits alimentaires (LANGDON, 1987 ; MAC EVILY et coll., 1991 ; REUTIMANN et coll., 1991)

But du travail.

En raison des controverses concernant l'utilisation du SO_2 en tant qu'antioxydant dans les produits alimentaires, notre premier objectif a été d'étudier les réactions chimiques dont la pâte de moutarde est le siège, quand SO_2 est ajouté.

Nous nous sommes tout particulièrement intéressés au devenir de cet additif, à ses formes d'oxydation et aux interactions de ces produits d'oxydation avec certains constituants de la moutarde.

Afin de remplacer éventuellement les sulfites, notre travail a porté, dans un deuxième temps, sur des essais de remplacement du SO2 dans la moutarde, par différents composés naturels ou synthétiques, des extraits végétaux. Cette étape a également pour but de mieux comprendre les mécanismes des réactions d'oxydation dans la moutarde : l'efficacité de l'additif étant corrélée à son mode d'action.

La compréhension des mécanismes d'oxydation a été approfondie au cours de la troisième partie. Les modifications subies par les constituants de la moutarde au cours de l'autooxydation ont été étudiées. Notre attention s'est particulièrement portée sur les dérivés aminés et les glucides, substrats du brunissement non enzymatique, et sur les composés phénoliques, oxydés par voie enzymatique.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL.

Notre travail a porté sur des échantillons de moutarde de Dijon sulfitée ou non au moment de la fabrication. Ces échantillons nous ont été aimablement fournis par l'entreprise DUCROS (Beaune) que nous remercions à cette occasion.

La pâte de moutarde est conditionnée en flacons de verre capsulés "Twist-off", à raison de 200 g par pots. Les flacons sont conservés en chambre froide à 4°C avant leur utilisation.

II. METHODES.

1. Mesure de la consommation d'oxygène au cours de l'autooxydation de la moutarde.

1.1. Préparation des échantillons de moutarde.

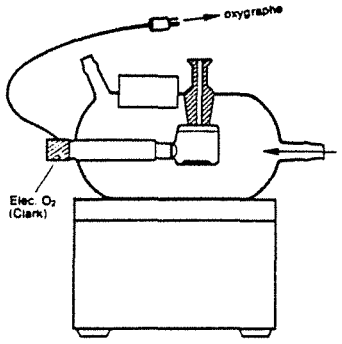
Nous avons utilisé pour nos essais une suspension de moutarde à 20% (p/v) dans du tampon acétate pH 3,8, correspondant à celui de la moutarde. La suspension est obtenue par homogénéisation de 4 g de pâte à 31% d'extrait sec dans 20 ml de tampon. La texture même de la pâte de moutarde ne permet pas d'envisager une solubilisation dans l'eau de l'ensemble de ses constituants. Un millilitre de la suspension contient 0,58 mg de constituants à l'état sec (0,18 g de pâte fraîche).

Notre étude nécessite l'emploi de suspensions fraîches, préparées chaque jour et saturées en oxygène par barbotage d'air comprimé filtré, pendant 5 minutes.

1.2. Utilisation de l'Oxygraphe GILSON.

L'Oxygraphe GILSON est utilisé pour déterminer la consommation d'oxygène en milieu liquide non conducteur ou en milieu gazeux. Il s'agit d'une méthode polarographique utilisant une microélectrode à oxygène (Electrode de Clark).

1.2.1. Appareillage.



La cathode est polarisée à - 0,8 V; la méthode est fondée sur la mesure d'un courant de dépolarisation dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en oxygène dissous dans le milieu.

1.2.2. Etalonnage.

La quantité totale d'oxygène dissous dans la cellule, à 25°C et à pH3,8 est déterminée à l'aide d'une solution de glucose à 1 mol/l, dans du tampon acétate 0,05 mol/l, en présence de glucose-oxydase.

En présence d'un excès de glucose, l'oxygène est consommé, sous l'action de la glucose-oxydase, selon la réaction :

$$\text{Glucose} + 1/2\ O_2 \longrightarrow \text{Gluconolactone} + H_2O_2$$

La consommation d'oxygène est suivie en fonction du temps dans une cellule d'une capacité de 2,0 ml. On ajoute, pour initier la réaction, 20 µl d'une solution enzymatique d'activité 100 UI/ml ; l'enzyme permet de fixer jusqu'à une micromole d'oxygène par minute.

La quantité d'oxygène dissous dans la cellule, à 25°C, est évaluée à 0,45 µmol.

1.2.3. Conditions de préparation des échantillons d'antioxydants.

L'activité antioxydante de différentes substances et d'extraits naturels a été étudiée à l'Oxygraphe.

- Extrait de romarin.

Nous avons utilisé un extrait commercial, fourni par la société C.A.L. Pfizer (Grasse, France). Ce produit est le résultat d'une extraction par le CO_2 en conditions supercritiques. L'extrait est dilué dans le méthanol avant utilisation.

- Thé vert.

L'extrait de thé vert est obtenu par décoction de 5 g de feuilles séches dans 40 à 50 ml d'eau distillée. L'ébullition est maintenue pendant 15 min. La suspension est filtrée sur büchner. Après refroidissement, le filtrat est amené à un volume de 200 ml avec de l'eau distillée.

- Dérivés d'Amadori.

Dans un tube à vis, on pèse 25 mg de cystéine et 100 mg de glucose (ou de xylose). On ajoute 5 ml de tampon phosphate 1 mol/l ; pH 5. Le tube est porté à 100°C pendant 30 minutes.

L'activité de molécules simples telles que l'α-tocophérol, l'EDTA, ou de certains phénols simples a également été étudiée. Dans le tableau 2, nous avons rassemblé les principaux additifs expérimentés en précisant leurs conditions d'utilisation.

Additif	Nature du solvant	Concentration (mol/l)
Catalyseur : $MnCl_2$	Eau	4.10^{-3}
Sulfite sodium	Eau	1
Acide ascorbique	Eau	1
α-tocophérol	Méthanol	0,5
(+)-catéchine	Méthanol	0,5
(-)-épicatéchine	Méthanol	0,5
Morine	Méthanol	0,5
E.D.T.A.	Eau	2.10^{-3}
Acide urique		0,5
Cystéine	HCl 0,1 Mol/l	0,5
Histidine	HCl 0,1 Mol/l	0,5
Dérivés d'Amadori	Tampon phosphate	/
Extrait romarin	Méthanol	50 g/l
Extrait thé vert	Eau	25 g/l

Tableau 2 : Additifs essayés.

1.2.4. Détermination de l'effet antioxydant.

L'additif étudié est ajouté à 2 ml de la suspension de moutarde à 20% (p/v), en début ou en cours d'oxydation. La réaction est suivie pendant 30 min. à 1 heure, à l'aide de l'Oxygraphe GILSON.

L'effet antioxydant est déterminé en fonction de la durée de la période de latence et de la diminution de la vitesse d'autooxydation.

1.3. Mesure par respirométrie.

Le respiromètre différentiel permet une mesure de la consommation d'oxygène, à température et à pression constante. Le dioxyde de carbone éventuellement dégagé est piégé dans une solution d'hydroxyde de potassium.

Pour chaque expérience, 2 fioles sont utilisées. La répartition des produits dans les fioles de GILSON est effectuée de la manière suivante :

En l'absence d'un dégagement gazeux, le compartiment central reçoit 0,2 ml de KCl à 20%. Si, en revanche, l'échantillon étudié dégage du gaz carbonique au cours de la réaction, le puits central est rempli avec 0,2 ml de KOH 20% (p/v). Pratiquement, l'une des fioles permet de mesurer l'absorption d'oxygène et le dégagement de dioxyde de carbone, tandis que la seconde, contenant KOH, permet d'atteindre, par différence, la consommation d'oxygène.

Le compartiment annulaire contient 5 ml de suspension de moutarde à 20%, seule ou en présence de différents réducteurs (NADH, SO_2, acide ascorbique), à une concentration finale de 1 mmol/l. Les témoins sont réalisés avec 5 ml de solution tampon contenant ou non les substances réductrices à raison de 1 mmol/l.

2. Etude des transformations de la pâte de moutarde à l'aide de systèmes modèles.

2.1. Oxydation par l'oxygène pur, sous pression élevée.

2.1.1. Appareillage.

L'oxydation est effectuée dans un autoclave en acier inoxydable au molybdène (Prolabo), d'une capacité de 250 ml, relié à un manomètre et à une double vanne permettant le remplissage et le contrôle de la pression.

La pâte de moutarde est introduite dans un tube en verre (diamètre = 5 cm, longueur =20 cm). L'ensemble est maintenu à température constante (20 ou 50°C) à l'aide d'une enceinte thermostatée.

2.1.2. Conditions opératoires.

L'autoclave est relié à une bombe d'oxygène pur. Quand le dispositif est mis en place la pression maximale disponible est de 150 bars en oxygène. Nous avons choisi de régler cette pression à 100 bars.

Deux séries d'expériences sont effectuées : la moutarde est soit maintenue à température ambiante pendant 7 jours, soit portée à 50°C pendant la même période. Des prélèvements sont effectués entre 0 et 7 jours.

2.2. Moutarde maintenue sous azote.

L'évolution des constituants de la moutarde est également étudiée en l'absence d'oxygène. Le contenu des flacons est désaéré par barbotage d'azote pendant 20 min. avant fermeture hermétique puis maintien soit à température ambiante, soit à 50°C pendant 7 jours.

3. Etude des modifications subies par les constituants de la moutarde au cours de l'autooxydation.

3.1. Dosage des composés réducteurs.

3.1.1. Dosage des sulfites.

Les sulfites résiduels sont dosés grâce à une méthode enzymatique (Coffret de dosage Boehinger, Mannheim).

3.1.1.1. Principe.

En présence d'oxygène, les sulfites sont oxydés en sulfates par la sulfite-oxydase :

$$SO_3^{2-} + O_2 + H_2O \xrightarrow{SO2\text{-}OD} SO_4^{2-} + H_2O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène formé est réduit par la NADH peroxydase (NADH-POD) en présence de NADH, selon la réaction :

$$H_2O_2 + NADH + H^+ \xrightarrow{NAD\text{-}POD} 2\,H_2O + NAD^+$$

La quantité de NADH consommé est égale à la quantité de sulfite présent. La concentration en NADH est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm.

3.1.1.2. Réactifs.

Solution NADH :	NADH	0,4	mg
	Tampon triéthanolamine pH 8,0	1	ml

Suspensions enzymatiques :

NADH-POD	suspension à 10 U/ml
SO_2-OD	suspension à 2,5 U/ml

3.1.1.3. Préparation des échantillons.

Deux millilitres de la suspension de moutarde à 20% sont centrifugés à 10 000g pendant 10 min. Le culot est remis en suspension dans 2 ml de tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l, puis on procéde à une nouvelle centrifugation, dans les mêmes conditions. Les surnageants sont réunis et filtrés sur préfiltre Millipore.

La réaction enzymatique est développée à pH 8,0. Des essais préliminaires nous ont permis d'observer que, pour ce pH, la coloration jaune du filtrat était nettement accentuée, ce qui entraîne des interférences lors du dosage spectrophotométrique. Cette coloration est attribuée aux flavonoïdes. Nous avons donc ajouté dans chaque filtrat 0,5 g de polyvinylpolypyrolidone (PVPP). Cet adsorbant insoluble facilite l'élimination des composés phénoliques par simple filtration sur filtre plissé.

3.1.1.4. Préparation de la PVPP.

La PVPP est mise en suspension et portée à ébullition dans HCl 2N pendant 30 min. Après refroidissement, le polymère est lavé à l'eau distillée, jusqu'à élimination de toute trace d'acidité. La poudre est séchée sur fritté et conservée à l'abri de la lumière.

3.1.1.5. Dosage.

0,1 ml du filtrat obtenu sont utilisés pour le dosage. On ajoute à ce milieu 1 ml de la solution de NADH, 0,01 ml de la suspension de NADH-peroxydase et 1,9 ml d'eau distillée.

Après 5 min. la densité optique est lue à 340 nm au spectrophotomètre. Cette valeur de D.O. est appelée A_1.

La réaction est initiée par l'addition de 0,05 ml de sulfite-oxydase. L'ensemble est homogénéisé, la densité optique est lue à la fin de la réaction, après 20 à 30 min. environ. Cette valeur de D.O. est appelée A_2.

Dans la cuve de référence sont rassemblés tous les réactifs en solution dans 2,0 ml d'eau distillée. La différence de densité optique entre les deux lectures ($\delta A = A_2 - A_1$) est proportionnelle à la quantité de NADH oxydé, donc à la quantité de SO_2 présent.

3.1.1.6. Calcul.

Pour une cuve de 1 cm. de trajet optique, la concentration en SO_2 est donnée par l'équation :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times v} \times \delta A \quad \text{en mg } SO_2/l$$

Avec V = Volume final dan la cuve (ml)

PM = Poids moléculaire des sulfites (g/mol)

v = Volume d'échantillon (ml)

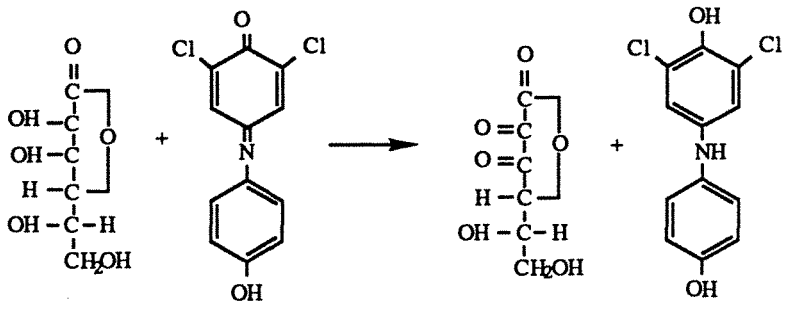
ε = Coefficient d'extinction moléculaire du NADH (l. $mmol^{-1}$. cm^{-1}).

3.1.2. Dosage de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique est dosé par ampéromètrie.

3.1.2.1. Principe.

Une différence de potentiel est appliquée entre deux électrodes de platine plongeant dans la solution à doser. Le courant résultant est mesuré. L'acide ascorbique est oxydé par une solution de 2-6 dichlorophénol indophénol (DCPIP), en acide déhydroascorbique, selon la réaction :

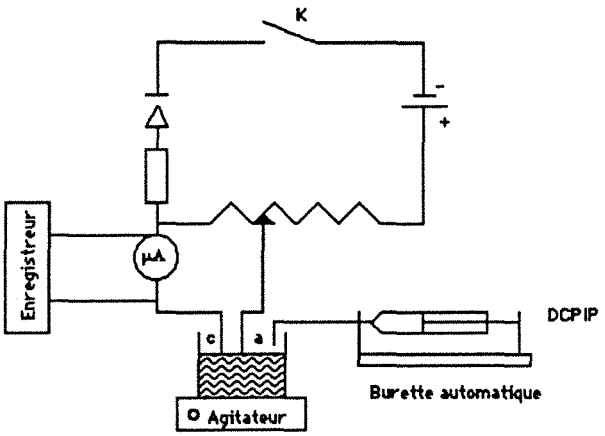


Acide ascorbique DCPIP

La variation de différence de potentiel est suivie au cours de la titration. Le point d'équivalence est marqué par une augmentation rapide du courant.

Les électrodes de platine assurent le rôle d'anode et de cathode ; un courant n'apparaît que lorsque les formes réduite ou oxydée de l'un des réactifs sont en concentration suffisante. Aucun courant n'est observé tant que le DCPIP sous forme oxydée n'est pas en excès. Après le point d'équivalence, le courant est une fonction linéaire de la concentration en DCPIP en excès.

3.1.2.2. Appareil.



3.1.2.3. Mode opératoire.

La quantité résiduelle est mesurée sur une suspension de moutarde à laquelle on a ajouté l'acide ascorbique à une concentration de 1 mmol/l.

Dans un vase à réaction, on introduit 5 ml de la suspension de moutarde à 20% et 10 ml de tampon citrate-HCl à pH 2,5 ; 0,1 mol/l.

La burette automatique, remplie de DCPIP à 0,5 g/l dans l'eau, est mise en route en même temps que l'enregistreur (Servotrace).

3.1.2.4. Calculs.

Le point d'équivalence est déterminé en traçant les tangentes des deux parties de la courbe de titration.

La concentration est obtenue par l'équation :

$$C = \frac{DXMXL}{vX5}$$ (en moles d'acide ascorbique par litre)

avec D = Débit de la burette (ml/mn.)
v = Vitesse de défilement du papier (cm/mn.)
M = Concentration de la solution de DCPIP (mol/l)
L = Longueur de papier mesurée (cm)

3.1.3. Dosage du NADH.

3.1.3.1. Préparation des échantillons.

La quantité résiduelle de réducteur est déterminée sur une suspension de moutarde à laquelle on a ajouté le NADH à une concentration de 1 mmol/l.

Deux millilitres de la suspension de moutarde à 20% sont centrifugés à 10 000g pendant 10 min. Le culot est remis en suspension dans 2 ml de tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. On procède à une seconde centrifugation, dans les mêmes conditions. Les surnageants sont réunis et filtrés sur préfiltre Millipore.

Nous avons ajouté dans chaque filtrat 0,5 g de PVPP afin de fixer les composés phénoliques. L'ensemble est éliminé par filtration sur filtre plissé.

La densité optique est lue à 340 nm contre un témoin d'eau distillée.

3.1.3.2. Calcul.

La concentration est obtenue d'après l'équation :

$$c = \frac{A}{\varepsilon l}$$ en mmol NADH/l

Avec A = Absorbance

l = Longueur du trajet optique (cm)

ε = Coefficient d'extinction moléculaire de NADH (l. mmol-1. cm-1)

3.1.4. Mesure du pouvoir réducteur.

3.1.4.1. Méthode au ferricyanure de potassium.

La méthode utilise la capacité des composés oxydables à réagir avec le ferricyanure, en présence d'ion Fe^{2+} pour former un complexe coloré en bleu (Bleu de Prusse). L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre, à 700 nm.

a. Réactifs.

- Cyanure :

Carbonate de sodium		0,53	g
Cyanure de potassium		0,065	g
Eau	q.s.p.	100	ml

- Ferricyanure :

Ferricyanure de potassium		0,05	g
Eau	q.s.p.	100	ml

- Alun ferreux :

Sulfate ferreux ammoniacal (alun)	1,5 g
Triton X 100	1 g
H_2SO_4 0,025 mol/l	1 l

b. Dosage.

A 100 µl de filtrat de pâte de moutarde, on ajoute 1 ml de réactif au cyanure et 1 ml de réactif au ferricyanure. Le mélange est chauffé dans un bain-marie bouillant pendant 15 min. Après refroidissement, 5 ml de la solution détergente sont ajoutés. L'intensité de la coloration bleue, stable est mesurée au spectrophotomètre à 700 nm.

Cette méthode permet le dosage des substances lentement oxydables tels que glucides réducteurs, lactones.

3.1.4.2. Méthode à l' α–α' bipyridyle ferrique.

Cette méthode permet le dosage des composés plus facilement oxydables tels que les composés phénoliques ou les produits issus des réactions de Maillard.

a. Réactifs.

- Alun de fer :

Alun de fer (Fe^{3+})	150	mg
Eau distillée	5	ml
H_2SO_4 concentré	0,2	ml

Attendre quelques heures jusqu'à dissolution complète, puis :

Eau distillée q.s.p.	50	ml

- Réactif à l'α–α' bipyridyle :

α–α' bipyridyle		50	mg
Eau distillée		45	ml
H_2SO_4	0,05 mol/l	4	ml

Après solubilisation :

Eau distillée q.s.p. 50 ml

b. Dosage.

Dans une cuve de spectrophotomètre, on mélange 0,1 ml de réactif à l'alun ferrique et 3,4 ml de réactif à l'α–α' bipyridyle. Une légère coloration jaune se développe et se stabilise au bout de 3 min. La mesure est effectuée à 510 nm. La densité optique de la cuve est fixée à 0.

On injecte dans la cuve 100 µl de filtrat de pâte de moutarde. La D.O. est mesurée à l'équilibre après 3 min.

3.2. Etude de l'oxydation des lipides.

3.2.1. Identification des acides gras de la pâte de moutarde.

3.2.1.1. Extraction des lipides.

Les lipides contenus dans 10 g de pâte de moutarde sont extraits à l'éther de pétrole. L'extraction est effectuée dans un appareil de Sohxlet, en phase liquide-liquide.

La pâte est homogénéisée dans le minimum d'eau (20 ml) et transférée dans le corps du Soxhlet, d'une capacité de 60 ml. L'extraction liquide-liquide est poursuivie pendant 6 heures à l'aide d'éther de pétrole.

L'éther de pétrole est alors séparé de la phase aqueuse et évaporé à 30°C, sous vide partiel, à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans 5 ml d'hexane.

3.2.1.2. Méthylation des acides gras libres.

a. Principe.

Les acides gras sont transformés, pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse, en esters méthyliques d'acides gras, plus volatils. Les acides gras libres sont estérifiés par le méthanol, en présence de trifluorure de bore (BF_3), selon l'équation :

$$R\text{-}COOH \xrightarrow{BF_3/CH_3OH} R\text{-}CO\text{-}CH_3$$

b. Mode opératoire.

Nous avons utilisé l'acide pentadécanoïque, à la concentration de 0,94 mg/tube comme étalon interne.

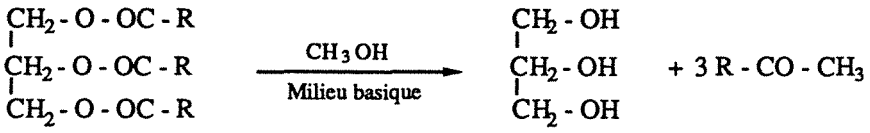
Un millilitre de l'extrait lipidique dans l'hexane est introduit dans un tube à vis puis évaporé à sec, à 30°C, sous vide (Evaporateur rotatif). On ajoute ensuite 5 ml de réactif BF3/méthanol (Merck) au résidu sec.

Le tube est porté pendant 5 min. à l'étuve à 110°C. Le méthanol est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif, à 30°C. L'addition dans les tubes de 1 ml d'hexane permet aux esters méthyliques de passer, après homogénéisation (Vortex) dans la phase supérieure. Un microlitre de la phase hexanique est injecté dans le chromatographe pour l'analyse.

3.2.1.3. Méthylation des acides gras estérifiés.

a. Principe.

Les principaux esters lipidiques sont des esters du glycérol. Ils sont transformés en esters méthyliques par trans-estérification par le méthanol, en milieu basique anhydre.



Nous avons effectué la transméthylation selon la méthode de METCALFE (1981), modifiée au laboratoire.

La méthode est fondée sur l'utilisation d'une base forte organique: l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH), en solution dans du méthanol anhydre.

b. Mode opératoire.

Un millilitre de la solution d'hexane contenant les lipides est placé dans un tube à vis et évaporé à sec, sous évaporateur rotatif à 30°C. Le tube contient également 0,94 mg d'acide pentadécanoïque qui sert d'étalon interne. Le résidu est finalement repris avec 3,00 ml d'éther éthylique (pour analyse, Merck).

On ajoute dans le tube 0,2 ml de réactif au TMAH, à 25 % dans le méthanol (Sigma). Le mélange réactionnel est ensuite agité vigoureusement pendant 5 mn.

3.2.1.4. Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras de la pâte de moutarde.

Les acides gras sous forme d'esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Girdel série 30 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne métallique (Inox) Silar 5 CP remplie à 10% de cyanopropyle adsorbé sur Chromosorb W AW (80-100 mesh), d'une longueur de 2 m et d'un diamètre interne de 2 mm.

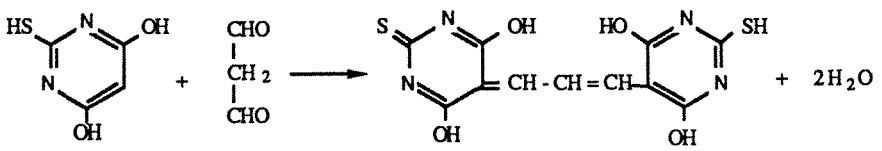
Les conditions de séparation sont les suivantes :

- Température de l'injecteur : 265°C
- Température du détecteur : 250°C
- Température du four : de 160 à 210°C
  - gradient de température : 3°C/min. puis
  - température finale : 210°C pendant 15 min.
- Gaz vecteur : N_2 Débit : 25 ml/min.

3.2.2. Mise en évidence du malonaldéhyde.

3.2.2.1. Principe.

L'oxydation de certains composés organiques, tels que les glucides notamment le désoxyribose et surtout les lipides, peut conduire à la formation de malonaldéhyde. Ce produit très réactif est capable de former avec l'acide thiobarbiturique un composé de couleur rose.



Acide thio-barbiturique — Malonaldéhyde

3.2.2.2. Mode opératoire.

0,25 g de pâte de moutarde sont homogénéisés avec 5 ml d'acide trichloroacétique à 0,1% (p/v) dans l'eau. L'homogénéisat est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min.

A 1 ml de surnageant, on ajoute 4 ml d'acide trichloroacétique à 20% (p/v) contenant 0,5% (p/v) d'acide thiobarbiturique.

Le mélange est porté à 90°C pendant 30 min avant d'être rapidement refroidi dans un bain de glace. Après centrifugation à 10 000g pendant 10 min, le surnageant est recueilli, sa densité optique est mesurée à 532 nm.

La concentration en malonaldéhyde est calculée en utilisant pour ε la valeur de 155 $mM^{-1}.cm^{-1}$.

3.3. Etude de l'oxydation des composés phénoliques.

3.3.1. Extraction des composés phénoliques (Figure 18).

Les phénols sont extraits à partir d'une moutarde préalablement délipidée en continu à l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet.

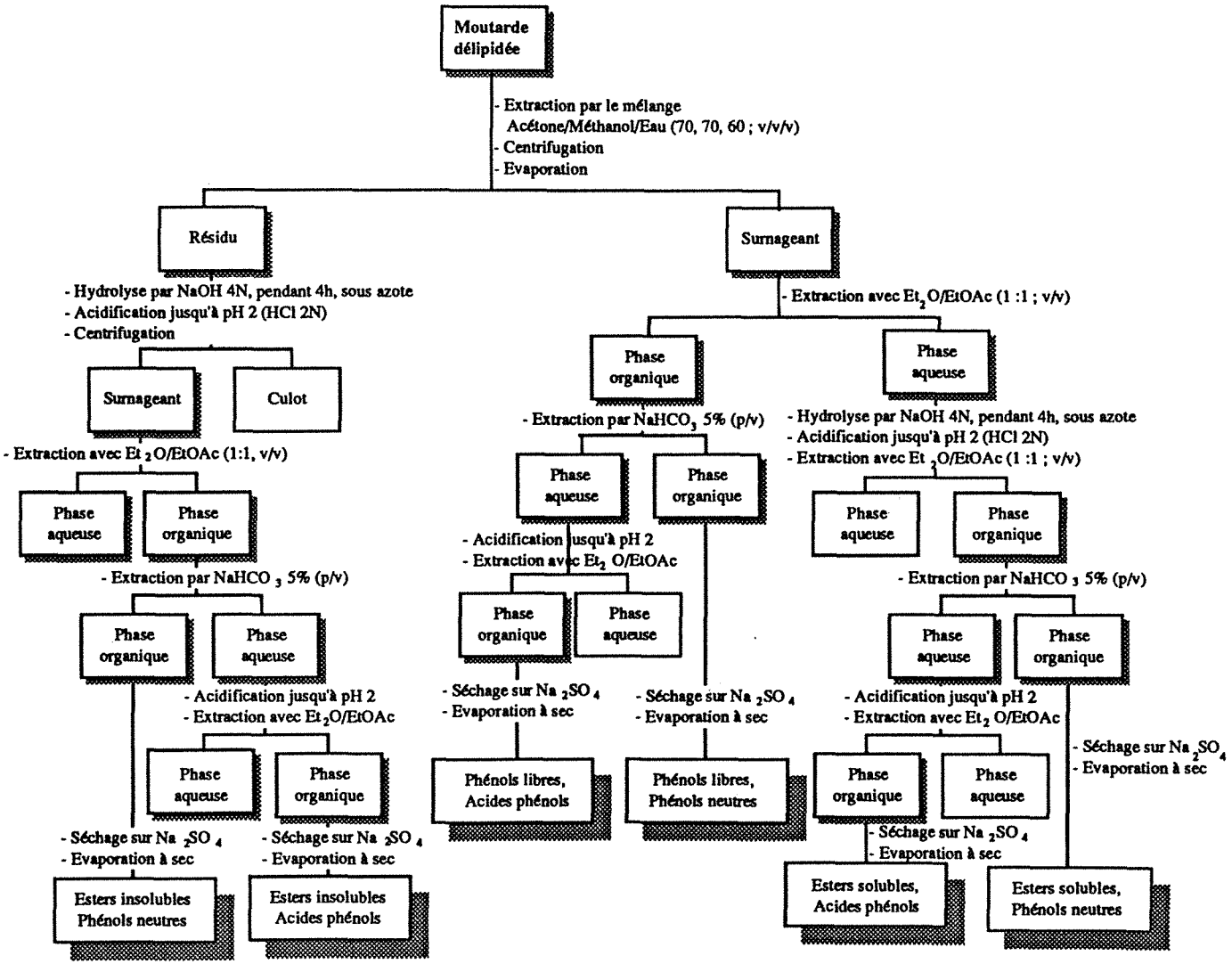
Nous avons utilisé la méthode décrite par KRYGIER et coll. (1982) pour extraire les composés phénoliques.

Dix grammes de moutarde en suspension dans l'eau sont délipidés à l'éther de pétrole. La fraction aqueuse est reprise dans un volume de mélange acétone/méthanol (1:1, v/v) en quantité suffisante pour atteindre une concentration en méthanol/acétone de 70% (v/v).

L'ensemble est agité puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 50 ml de mélange méthanol-acétone à 70% (v/v) (méthanol/acétone/eau ; 7:7:6, v/v/v). Après centrifugation, les surnageants sont réunis et concentrés sous vide à l'évaporateur rotatif à 40°C jusqu'à un volume final de 60 ml. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH 2 avec HCl 6 mol/l, puis centrifugée à 10 000g pendant 10 min.

La phase aqueuse résiduelle est extraite 3 fois par un mélange éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v) dans la proportion de un volume de mélange pour un volume de

Figure 18 : Extraction des composés phénoliques de la pâte de moutarde



phase aqueuse. La phase organique (E1), contenant les phénols et les acides phénoliques libres, est ensuite déshydratée avec Na_2SO_4 anhydre, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif.

La phase aqueuse résiduelle, renfermant les combinaisons insolubles dans le mélange Ether/Acétate d'éthyle, est soumise à une saponification à l'aide de 20 ml de NaOH 4 mol/l sous atmosphère d'azote, à température ambiante et pendant 4 heures.

L'hydrolysat est acidifié à pH 2, les acides phénoliques libérés engagés dans des fonctions esters (E2) sont extraits par le mélange éther éthylique-acétate d'éthyle.

Le culot de centrifugation obtenu après extraction des phénols solubles (E1) est utilisé pour mettre en évidence des acides phénoliques liés aux combinaisons insolubles (E3). Le culot est hydrolysé directement avec 10 ml de NaOH 4 mol/l, dans les mêmes conditions que pour les esters phénoliques solubles. Après acidification à pH 2 et centrifugation, le surnageant est extrait par le mélange éther éthylique-acétate d'éthyle, dans les mêmes conditions que précédemment.

On ajoute aux différentes fractions obtenues (phénols libres, esters phénoliques solubles et esters phénoliques insolubles) 15 ml d'hydrogénocarbonate de sodium à 5% (p/v). Cette étape entraîne la salification des acides phénoliques. Après extraction avec 30 ml d'éther éthylique, la phase aqueuse rassemble les acides phénols et la phase éthérée les phénols neutres.

L'acidification à pH 2 de la phase aqueuse provoque la protonation des acides phénoliques qui sont ensuite extraits avec 30 ml d'éther éthylique.

Après concentration sous vide, à l'évaporateur rotatif, les différents échantillons sont analysés par chromatographie sur couches minces et chromatographie en phase gazeuse.

3.3.2. Dosage des phénols totaux.

La quantité de composés phénoliques contenus dans les extraits est déterminée par la méthode au ferricyanure, décrite par BUDINI et coll. (1980).

On utilise cinquante microlitres de chaque solution méthanolique enrichie en composés phénoliques. La solution est amenée à 3 ml avec de l'eau distillée. On ajoute au mélange 200 µl d'une solution de $K_3Fe(CN)_6$ à 8 mmol/l et 200 µl d'une solution de $FeCl_3$ à 0,1 mol/l dans HCl 0,1 mol/l. La densité optique est lue à 700 nm après 5 min. Les résultats sont exprimés en mg de catéchine.

3.3.3. Identification des phénols et acides phénols.

3.3.3.1. Chromatographie sur couches minces.

L'identification des phénols et acides phénols est effectuée :

- par chromatographie sur couches minces de cellulose MN 300, avec élution à l'acide acétique à 2% (v/v) dans l'eau.

- par chromatographie sur papier Whatman n°1, avec pour solvant d'élution le mélange Isopropanol/ Ammoniaque/ Eau (8:1:1 ; v/v/v).

Les chromatogrammes sont observés en lumière ultraviolette (λ = 350 nm) afin de repérer les composés fluorescents. L'exposition aux vapeurs d'ammoniac permet de renforcer l'intensité de la fluorescence de certaines substances phénoliques.

Les acides phénols et phénols sont révélés par pulvérisation d'une solution de paranitroaniline diazotée puis de carbonate de sodium.

La composition des réactifs est la suivante :

- Paranitroaniline diazotée :

Acétate de sodium à 20% (p/v) dans l'eau	8	ml
Paranitroaniline à 0,5% dans HCl 2 mol/l	2	ml
Nitrite de sodium à 15%	4	gouttes

La formation d'un léger trouble traduit la formation du composé diazoté.

- Na_2CO_3 à 15% (p/v)

3.3.3.2. Chromatographie en phase gazeuse.

Les acides phénols extraits sont analysés par chromatographie en phase gazeuse, après dérivatisation.

a. Silylation.

Une fraction de l'extrait dans l'éther éthylique est introduite dans un tube à vis, évaporée à sec, puis abandonnée dans un dessiccateur sous vide, en présence de P_2O_5 pendant une nuit. Le résidu sec est repris par le mélange :

- 50 µl de pyridine anhydre
- 150 µl de N-N'- bis (triméthylsilyl, trifluoroacétamide) (B.S.T.F.A.) contenant 1% de triméthylchlorosilane (T.M.C.S.).

Le tube, hermétiquement fermé, est porté à 80°C pendant 30min. Après refroidissement à température ambiante, 1 µl du mélange est injecté dans la colonne chromatographique.

Les témoins phénoliques sont préparés à partir d'une solution mère à 0,05% (p/v) dans le méthanol. Une fraction aliquote de 1 ml, placée dans un tube à vis, est évaporée et silylée dans les conditions décrites précédemment.

b. Séparation chromatographique.

L'analyse chromatographique des composés phénoliques est effectuée sur un chromatographe PACKARD 427, muni d'un détecteur à ionisation de flamme. L'appareil est équipé d'une colonne capillaire garnie d'une phase OV1 adsorbée sur silice fondue, de 25 m de long et 0,32 mm de diamètre interne. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Gaz vecteur	:	Azote
Débit	:	30 ml/min
Température du détecteur	:	280°C
Température de l'injecteur	:	280°C
Température du four	:	
initiale	:	120°C
finale	:	260°C
programmation	:	4°C/min

3.3.3.3. Chromatographie HPLC.

Les phénols sont identifiés par chromatographie HPLC.

Nous avons utilisé un dispositif chromatographique constitué d'une pompe Merck L6200 et d'une colonne Lichrosorb Merck C18 5 µm de 25 cm, protégée par une précolonne C18. La détection est assurée par un détecteur à barrette de diodes Merck L3000, monté en série avec un détecteur électrochimique Eldec 103, équipé d'une électrode en carbone vitreux.

Le fractionnement des constituants est obtenu grâce à la mise en place d'un gradient de solvants. Le solvant A est composé d'acide formique à 5% (v/v) dans l'eau, le solvant B est du méthanol. La composition du gradient est la suivante :

Temps	% A	% B	Gradient
0	98	2	Isocratique
3	98	2	Linéaire
25	65	35	Linéaire
30	50	50	Linéaire

Le débit du solvant est fixé à 0,4 ml/min. Le détecteur U.V. est réglé à 254 et 280 nm., la différence de potentiel du détecteur électrochimique est fixée à + 1,00 V (contre une électrode $Ag/AgCl_2$).

3.4. Etude de l'oxydation des glucides.

3.4.1. Dosage de l'acide galacturonique. (BLUMENKRANTZ et ASBOEHANSEN, 1973)

3.4.1.1. Principe.

Le chauffage à 100°C du mélange acide uronique/tétraborate de sodium/H2SO4, en présence de méta-hydroxydiphényle (méta phényl phénol) conduit à la formation d'un produit coloré, de λmax égale à 520 nm.

3.4.1.2. Réactifs.

- Méta-hydroxydiphényle à 0,15% (p/v) dans NaOH à 0,5% (p/v). La solution est conservée à 4°C.
- Tétraborate de sodium à 0,0125 mol/l dans H_2SO_4 concentré.

3.4.1.3. Mode opératoire.

0,4 ml de la solution à doser sont traités par 2,4 ml de mélange H_2SO_4/tétraborate. Les tubes sont refroidis dans la glace pilée avant d'être portés à 100°C pendant 5 min. au bain-marie.

Parallèlement, un blanc contenant 0,4 ml de la solution à doser et 2,4 ml de réactif H_2SO_4/tétraborate est traité dans les mêmes conditions.

Les tubes sont refroidis et maintenus dans la glace, on y ajoute 40 µl de réactif au méta-hydroxydiphényle. Une fois le mélange homogénéisé, on laisse la coloration rose se développer pendant 5 min.

La densité optique est lue à 520 nm. Une gamme étalon, contenant de 20 à 200 µg/ml d'acide galacturonique sert de référence.

3.4.2.. Dosage des sucres libres par chromatographie en phase gazeuse

Les sucres sont analysés après oximation et acétylation selon la méthode mise au point au laboratoire.

Extraction.

Les sucres libres sont extraits dans l'eau bouillante. Afin d'éviter une hydrolyse des glucides en milieu acide, 15 g de pâte de moutarde sont dispersés dans une suspension de $CaCO_3$ à 10% (p/v), en quantité suffisante pour obtenir un pH de 6,5-7. Le mélange est chauffé, l'ébullition est maintenue pendant 15 min. Le mélange est filtré sur büchner et rincé à l'eau chaude. Les protéines sont précipitées par addition dans le filtrat de 20 ml d'une solution de $Pb(CH_3COO)_2, 3\ H_2O$ à 30% (p/v). L'excès de $Pb(CH_3COO)_2, 3\ H_2O$ est éliminé par Na_2HPO_4 à 20% (p/v)

Après centrifugation, le surnageant est dialysé puis lyophilisé avant d'être repris dans 5 ml d'eau pour l'analyse.

Dérivatisation.

Dans un tube à vis, on place 1 ml de la solution glucidique. L'eau est évaporée sous vide à 40°C. Le résidu est placé au dessiccateur, sous vide, pendant une nuit. On ajoute dans chaque tube 0,5 ml de réactif d'oximation, constitué de :

- 10 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine
- 0,5 ml de pyridine anhydre
- 2,5 mg de myoinositol, utilisé comme étalon interne.

Le tube, hermétiquement fermé, est ensuite placé à l'étuve à 90°C pendant 30 min. Après refroidissement, on ajoute 1,5 ml d'anhydride acétique (Merck). Le mélange réactionnel est placé à nouveau à l'étuve à 90°C pendant 30min.

Le tube est refroidi puis maintenu dans la glace. L'excès d'anhydride acétique est éliminé par addition de 2 ml d'eau distillée dans le tube.

Un millilitre du mélange réactionnel est transféré dans un tube à vis propre et sec dans lequel on ajoute 0,5 ml de chloroforme pour analyse (Merck). L'ensemble est agité vigoureusement ; après équilibre des deux phases, la phase supérieure aqueuse est éliminée.

Les sucres témoins sont traités dans les mêmes conditions, nous avons utilisé des concentrations comprises entre 2 et 20 mg pour l'établissement de la gamme étalon.

Séparation.

La séparation est effectuée sur un chromatographe PACKARD 427 muni d'un détecteur à ionisation de flamme, équipé d'une colonne en verre (4 m long X 1,7 mm diamètre interne) remplie de phase NPGS (néopentylglycolsuccinate) à 5% adsorbée sur Chromosorb WAW 100-120 mesh.

La séparation est obtenue dans les conditions suivantes :

- Gaz vecteur : Azote
  Débit : 30 ml/mn.
- Température injecteur : 200°C

- Température détecteur : 250°C
- Température four :
  - initiale : 195°C
  - finale : 210°C
  - programmation : 1°C/min puis 210°C pendant 10 min

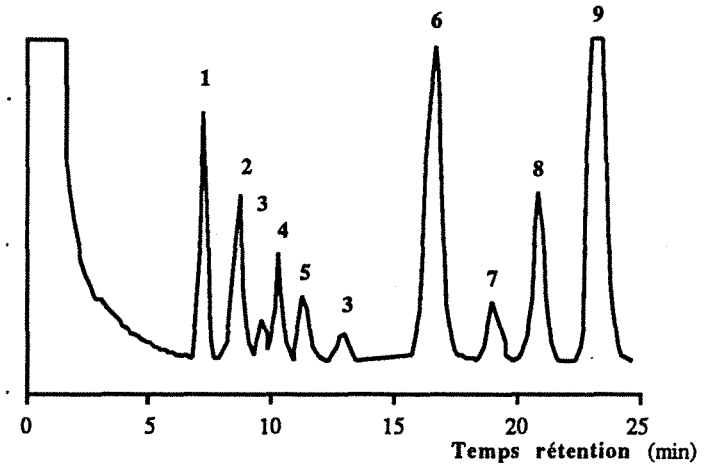


Figure 19 :Analyse chromatographique des sucres témoins par C.P.G.

(Colonne NPGS à 5% ; Température : injecteur 200°C, détecteur 250°C ; programmation : 195°C ⟶ 210°C, 1°C/min, puis 210°C pendant 10 min ; volume d'injection : 2 ml).
1. Rhamnose- 2. Fucose- 3. Arabinose- 4. Fructose- 5. Xylose- 6. Mannose -7. Glucose- 8. Galactose - 9. Inositol (étalon interne) -

Deux microlitres de chaque échantillon sont injectés pour l'analyse.

3.5. Etude des fractions proteiques.

3.5.1. Dosage des protéines.

En raison de la présence de nombreux composés susceptibles d'intervenir dans le dosage (phénols notamment), nous avons choisi d'utiliser la méthode de BRADFORD (1976). Cette méthode présente également l'avantage d'être sensible.

3.5.1.1. Réactif.

Bleu Coomassie G 250		100 mg
H_3PO_4	85%	100 ml
Ethanol	95%	50 ml
Eau distillée	q.s.p.	1 l

3.5.1.2. Dosage.

1 ml de solution protéique est mélangé à 4 ml de réactif au Bleu Coomassie. La densité optique est mesurée à 595 mn après 2 minutes.

Les concentrations sont déterminées par comparaison avec une courbe étalon établie à partir de solutions de BSA dont les concentrations sont comprises entre 1 et 10 µg/ml.

3.5.2. Dosage des composés α-aminés.

Les dérivés α-aminés sont dosés selon la méthode décrite par GHUYSEN et coll. (1965).

A cent microlitres d'hydrolysat on ajoute 25 µl d'une solution de tétraborate de potassium à 5 % (p/v) dans l'eau, ainsi que 10 ml d'une solution alcoolique de dinitrofluorobenzène (DNFB) à 1,3%. Le mélange est agité pendant 30 min à 60°C. Après refroidissement, on ajoute 1,5 ml d'HCl 2 mol/l.

L'intensité de la coloration est déterminée au spectrophotomètre à 420 nm.

3.6. Dosage du fer.

3.6.1. Méthode spectrophotométrique.

Le fer est dosé dans la moutarde par spectrométrie d'absorption atomique. L'élément est dosé sous forme libre (Fe^{2+} et Fe^{3+}) par mise en solution dans l'eau.

Parallèlement, le fer engagé dans des liaisons insolubles est également dosé, après passage en solution et dégradation des complexes ferreux ou ferriques. La minéralisation permet de dégager le fer engagé dans ces structures.

3.6.1.1. Réactifs

Nitrate de strontium à 10 g/100 ml (soit 0,67 mol/l) dans l'eau
Acide nitrique fumant d = 1,42

3.6.1.2. Préparation des échantillons

Echantillons destinés au dosage du fer libre

Dans un pot de centrifugation de 250 ml, on introduit une suspension de 10 g de moutarde dans 50 ml d'eau distillée. L'ensemble est homogénéisé puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min. La phase liquide est transférée dans une fiole jaugée de 100 ml contenant 1 ml de nitrate de strontium (6,7 mmol).

Minéralisation

Dans un pot de centrifugation de 250 ml, on introduit une suspension de 10 g de moutarde dans 10 ml d'eau distillée puis on ajoute à ce mélange 40 ml d'acide nitrique fumant. L'ensemble est homogénéisé et laissé en contact pendant 40 minutes à 50°C avant centrifugation à 5000 g pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans une fiole jaugée de 100 ml que l'on complète avec 1 ml d'une solution aqueuse de nitrate de strontium à 0,67 mol/l et un volume suffisant d'eau distillée.

La gamme étalon est établie avec des solutions de $Fe_2(SO_4)_3$ pour des concentrations finales en fer de 100, 200 et 400 mg/l. Ces solutions contiennent en outre 1 ml de nitrate de strontium à 0,67 mol/l pour 100 ml de mélange.

Des témoins contenant, l'un 99 ml d'eau et 1 ml de nitrate de strontium, l'autre 40 ml d'acide nitrique fumant dans 100 ml sont également préparés.

Pour doser le fer dans la moutarde, nous nous sommes référés d'une part à un étalonnage direct, d'autre part à un étalonnage selon la méthode des ajouts dosés. La gamme d'étalonnage est obtenue par addition de quantités croissantes de fer dans des volumes identiques de solution à doser.

Le fer est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique. L'appareil Perkin-Elmer 1100 est équipé d'une lampe à cathode creuse. La raie d'absorption pour le fer est fixée à 248,3 nm. La flamme utilisée est constituée d'un mélange acétylène-air (acétylène 2,5 l/mn, air 8 l/mn).

3.6.1.3. Résultats

Le fer total correspond au fer dosé après minéralisation de l'échantillon. Le fer soluble est dosé directement sur les échantillons, sans minéralisation. Le fer lié insoluble est obtenu par différence entre ces deux valeurs.

3.6.2. Dosage du fer par la bathophénantroline

Nous avons utilisé une méthode adaptée de celle de LEE et CLYDESDALE (1979).

Principe

Les formes ioniques du fer soluble sont dosées par la bathophénantroline qui forme avec le fer ferreux (Fe^{2+}) un complexe coloré en rose, de λmax égale à 533 nm.

Les ions Fe^{3+} sont dosés après réduction par l'hydroquinone.

Réactifs

- Bathophénanthroline (4,7-diphényl-1,10-phénanthroline) : Solution à 120 mg par litre d'éthanol à 95%.

- Hydroquinone : Solution à 10% (p/v) dans l'éthanol à 50%.

Mode opératoire

Dosage des ions ferreux.

A 2 ml de suspension de moutarde à 20% (p/v), on ajoute 3 ml de solution de bathophénanthroline. Après 10 min, le complexe coloré est extrait par 2 ml de chloroforme. Les tubes sont agités, après équilibre des phases, la phase inférieure est recueillie et amenée à un volume final de 5 ml par de l'éthanol. La densité optique est lue à 533 nm.

Dosage des ions ferreux et ferriques

Les tubes sont traités dans les mêmes conditions que pour les ions Fe^{2+}, on ajoute 1 ml de solution d'hydroquinone en même temps que la solution de bathophénanthroline.

4. Mise en évidence des activités enzymatiques dans la pâte de moutarde.

4.1. Extraction des enzymes de la pâte de moutarde.

Quatre grammes de pâte de moutarde sont mis en suspension dans 20 ml de tampon acétate (0,05 mol/l ; pH 4,5). La suspension est centrifugée à 10 000 g pendant 15 min. Le culot est repris dans 10 ml de tampon acétate puis centrifugé à 10 000 g pendant 15 min, l'opération est renouvelée 2 fois. Les surnageants sont mélangés, la solution résultante est filtrée sur filtre sans cendres.

4.2. Mesure de l'activité peroxydasique.

4.2.1. Méthode à l'orthodianisidine.

4.2.1.1. Principe.

L'activité peroxydasique est déterminé par l'absorption spectro-photométrique d'un extrait de moutarde, à 460 nm en présence d'orthodianisidine.

4.2.1.2. Mode opératoire.

Dans la cuve de référence, on place :

- H_2O_2 0,1 mol/l : 0,20 ml
- Tampon acétate pH 3,8 0,05 mol/l : 2,96 ml
- Orthodianisidine à 0,5% (p/v) dans le méthanol : 0,02 ml

La cuve d'essai contient :

- H_2O_2 0,1 mol/l : 0,20 ml
- Tampon acétate pH 3,8 0,05 mol/l : 2,76 ml
- Extrait de moutarde (peroxydase) : 0,20 ml
- Orthodianisidine à 0,5% (p/v) dans le méthanol : 0,02 ml

4.2.2. Mesure de l'activité en présence de polyphénoloxydase

Principe

La méthode repose sur une mesure de l'activité enzymatique en présence d'un inhibiteur des PPO : la tropolone qui complexe les ions Cu^{2+} contenus dans le site actif de l'enzyme (TANAKA et coll., 1989). On peut ainsi distinguer l'activité propre à la peroxydase de celle de la polyphénoloxydase.

Réactif

- 100 ml de tampon phosphate 0,05 M ; pH 6,5
- 10 ml gaïacol à 1% dans 50 ml de méthanol
- 10 ml H_2O_2 0,3% (ajouté extemporanément)

Mode opératoire

L'activité est mesurée spectrophotométriquement. Le milieu réactionnel contient 2 ml du réactif gaïacol/H_2O_2 et 5 ml d'extrait enzymatique. La variation de D.O. est suivie à 470 nm. Au cours de la réaction, on ajoute des quantités croissantes (de 0 à 400 µmol/l) de tropolone (2-hydroxy 2,4,6-cycloheptatriénone).

4.3. Mesure de l'activité polyphénoloxydasique.

4.3.1. Principe.

L'activité polyphénoloxydasique est déterminée par spectrophotométrie en suivant la transformation du cathéchol en quinone correspondante.

4.3.2. Mode opératoire.

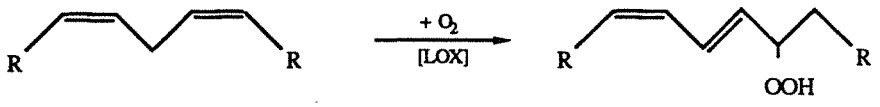
Dans une cuve de spectrophotomètre, sont introduits successivement :

- 0,2 ml d'extrait enzymatique
- 0,2 ml de solution de catéchol à 0,05 mol/l dans le méthanol
- 2,6 ml de tampon phospahte pH 6,5

4.4. Mesure de l'activité lipoxygénasique.

4.4.1. Principe

L'activité lipoxygénasique est mesurée en présence d'acide linoléique (C_{18} cis, cis Δ 9,12). Cet acide gras non saturé est autooxydé sous l'action de l'enzyme selon la réaction :



L'activité est déterminée par la mesure de la consommation d'oxygène, à l'Oxygraphe.

4.4.2. Méthode

Le milieu réactionnel contient :

- 0,5 ml d'extrait enzymatique
- 0,5 ml d'acide linoléique (11 mmol/l)
- 1 ml de tampon borate de sodium 0,1 mol/l ; pH 7

La température étant fixée à 25°C, la réaction est poursuivie pendant 30 min. Un essai contenant tous les réactifs et 0,5 ml de préparation enzymatique dénaturée à 100°C pendant 5 min. sert de témoin.

5. Etude des produits intermédiaires formés au cours de l'oxydation de la moutarde.

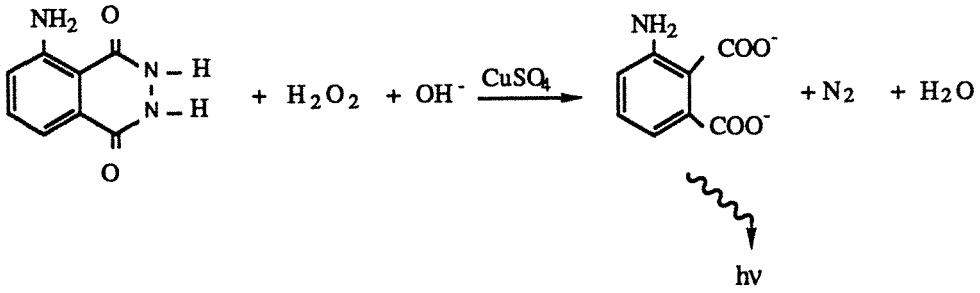
5.1. Dosage de H_2O_2 formé dans le milieu au cours de l'oxydation de la moutarde.

5.1.1. Par luminométrie.

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de dosage de PERKIN (1982) Cette méthode par chimioluminescence permet en effet de doser des quantités de l'ordre de 30 nanomoles par litre.

5.1.1.1. Principe.

En milieu basique, l'oxydation du 3-amino phtalhydrazide (Luminol) par H_2O_2, en présence d'un catalyseur (Cu^{2+}), se traduit par une émission de lumière, selon la réaction :



L'émission de lumière est mesurée à 425 nm au cours du temps, à l'aide du luminomètre LUMAC.

5.1.1.2. Préparation des échantillons.

Deux millilitres de la suspension de moutarde à 20% sont centrifugés à 10 000g pendant 10 min. Le culot est remis en suspension dans 2 ml de tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. On procéde à une seconde centrifugation, dans les mêmes conditions. Les surnageants sont réunis et filtrés sur préfiltre Millipore.

La réaction se déroule à un pH de 12. Dans cette zone de pH, la coloration jaune du filtrat est nettement accentuée, ce qui entraîne des interférences lors du dosage. Les composés phénoliques, responsables de cette coloration, sont éliminés par adsorption sur 0,5 g de PVPP.

5.1.1.3. Réactifs.

- Solution de Luminol (10^{-3} mol/l.) :

Luminol	0,18 g
NaOH	1 g
Eau fraîchement distillée	1 l

- Solution catalytique (2 mmol/l)

$CuSO_4, 5\ H_2O$	0,5	g
Ammoniaque 0,2 mol/l	121,4	ml
Eau distillée q.s.p.	1	l

Les solutions sont stockées à 4°C avant leur utilisation, le Luminol ne peut être utilisé qu'après stabilisation de la solution au bout de 48 heures.

5.1.1.4. Mode opératoire.

Dans trois tubes de 3 ml de capacité, on introduit :

- Tube 1 :	Eau distillée	: 200 µl
	Tampon phosphate pH 7 ; 0,05 mol/l	: 200 µl
- Tube 2 :	Extrait de moutarde	: 200 µl
	Tampon phosphate pH 7	: 200 µl
- Tube 3 :	Extrait de moutarde	: 200 µl
	Tampon phosphate pH 7	: 200 µl
	Catalase (65000 UI/mg ; 20 mg/ml)	: 0,4 µl

Les mélanges réactionnels sont placés pendant 15 minutes dans un bain d'eau maintenu à 30°C pour permettre le développement de la réaction avec la catalase. Cette réaction enzymatique permet de détruire H_2O_2 présent et de déterminer, par différence, sa contribution à la bioluminescence de chaque échantillon.

Les tubes en plastique, adaptés au luminomètre et contenant 50 µl de mélange réactionnel plus 100 µl de Luminol, sont placés dans la chambre de mesure. Le catalyseur (100 µl) est injecté automatiquement, la lecture est effectuée au bout de 2 secondes.

Parallèlement, dans les tube 1 et 2, contenant chacun 50 µl de mélange, on rajoute 10 µl d'une solution de H_2O_2 100 µmol/l. Les comptages permettent d'évaluer le rendement de la réaction pour un milieu donné, en prenant pour 100% le mélange H_2O/Tampon/H_2O_2.

5.1.1.5. Calculs.

Tubes / Substrats	1	2	3	4	5
Tampon acétate (µl)	50	50	0	0	0
Milieu réactionnel (µl)	0	0	50	50	50
H_2O_2 100 µM (µl)	0	10	0	10	0
Catalase (µl)	0	0	0	0	0,4
Luminol (µl)	100	100	100	100	100
Luminescence (comptages)	A	B	C	D	E

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des compositions des différents milieux réactionnels utilisés pour le dosage de H_2O_2.

- Rendement : $K = \frac{D - C}{B - A}$

- Quantité réelle d'H_2O_2 :

$$Q = \frac{C - E}{K} = \frac{\text{quantité de peroxyde d'hydrogène apparente}}{\text{Rendement}}$$

La concentration en H_2O_2 est déterminée en se reportant à une courbe d'étalonnage, établie dans les mêmes conditions, avec des solutions de H_2O_2 de concentrations comprises entre 0,05 et 100 µmol/l.

5.1.2. Méthode radioactive.

La quantité de peroxyde d'hydrogène libéré est mise en évidence par la méthode décrite par HAREL et KANNER (1985).

5.1.2.1. Principe.

La méthode de HAREL et KANNER repose sur l'oxydation du formiate en CO_2 : le formiate est oxydé par de faibles quantités d'H_2O_2, en présence d'un large excès de

catalase. La réaction est inhibée par l'activité peroxydasique de la catalase, sachant que le formiate est un inhibiteur de radicaux OH°.

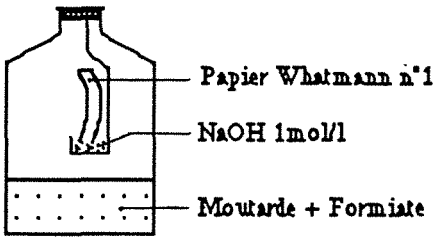
La quantité de peroxyde d'hydrogène formé dans le milieu est une fonction directe du $^{14}CO_2$ mesuré.

5.1.2.2. Réactifs.

- Formiate : 2 mmol/ml ; 1 µCi/ml
- Catalase : 900 UI/ml
- Tampon acétate pH 3,8 ; 0,05mol/l.
- Acide acétique pur
- NaOH 1 mol/l

5.1.2.3. Mode opératoire.

La réaction est effectuée dans des flacons à plasma de 125 ml. Le flacon contient le milieu réactionnel, un creuset contenant 1 ml de soude (1 mol/l) est maintenu au dessus du milieu réactionnel. La soude permet de piéger le CO_2 libéré au cours de la réaction. Une rondelle de papier Whatmann n°1, trempée dans le creuset, permet d'augmenter la surface de contact.



Les temps d'incubation varient de 0 à 60 min. Pour chaque temps d'incubation, deux essais sont effectués : un en présence de formiate seul, un additionné de catalase. La répartition des réactifs dans les flacons est la suivante :

Flacon	T	T'	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate (ml)	20	20	/	/	/	/	/	/	/	/
Moutarde dans tampon (ml)	/	/	20	20	20	20	20	20	20	20
Catalase (µl)	/	50	/	50	/	50	/	50	/	50
Formiate (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Temps d'incubation (min)	30	30	0	0	15	15	30	30	60	60

Une série de flacons est incubée à 20°C, une autre à 50°C. La réaction est stoppée par injection, à travers le bouchon en caoutchouc, de 2 ml d'acide acétique pur.

La rondelle de papier Whatmann est transférée dans un flacon de comptage contenant 10 ml de liquide de scintillation (Instagel). La radioactivité est mesurée après 4 heures à l'aide d'un compteur Packard.

5.2. Mise en évidence de la formation de H_2O_2 lors de la réaction catalysée par la peroxydase.

La formation de peroxyde d'hydrogène, liée à la présence de peroxydase, lors de l'oxydation de la moutarde est établie selon la méthode décrite par MADER et coll. (1981).

La peroxydase catalyse l'oxydation du NADH par O_2 avec formation d'anions superoxydes.

Dans une cuve de spectrophotomètre de 1 ml, on dispose 0,2 mmol de NADH et 20 µmol de $MnCl_2$. On y ajoute 0,1 ml d'extrait de moutarde. La dégradation du NADH est suivie à 340 nm. Après 10 min de réaction, on ajoute au milieu réactionnel la même quantité d'extrait enzymatique et 5 µmol/l de gaïacol. La formation de peroxyde d'hydrogène dans le milieu est déterminée en fonction de l'oxydation du gaïacol à 470 nm.

5.3. Dosage du furfural et de l'hydroxyméthylfurfural.

Les principaux dérivés du furfural responsables du brunissement sont identifiés et dosés par chromatographie liquide haute performance, selon la méthode de JEURING et KUPPERS (1980).

Les dérivés sont séparés en phase inverse, sur colonne C_{18} 5 µm, de 250 mm de long sur 4 mm de diamètre (LiChrospher 100 RP 18 ; Merck).

Le solvant d'élution est un mélange méthanol-eau (10:90, v/v). La colonne est placée en série avec une pompe BioRad 1330 dont le débit est fixé à 1 ml/mn.

La détection est assurée par un détecteur U.V. (Pye Unicam LC-UV), à une longueur d'onde de 280 nm.

5.4. Analyses spectrophotométriques de l'évolution des constituants de la moutarde.

5.4.1. Composés hydrosolubles.

Les propriétés spectrophotométriques des composés hydrosolubles sont étudiées à partir de suspensions de moutarde à 20% dans du tampon acétate. Deux millilitres de suspension sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 2 ml du même tampon, puis recentrifugé à 10 000g pendant 10 min. Les surnageants sont réunis et filtrés sur préfiltre Millipore. Le filtrat est analysé au spectrophotomètre, à des longueurs d'onde comprises entre 200 et 600 nm, après extraction à l'éther éthylique pour limiter les interférences dues notamment aux composés phénoliques.

5.4.2. Composés liposolubles.

Les propriétés spectrales des composés liposolubles sont étudiées en fonction de la solubilité de ces constituants dans différents solvants apolaires. Nous avons utilisé comme agents d'extraction l'éther éthylique, l'hexane ou encore l'éther éthylique suivi du méthanol.

Deux millilitres de suspension de moutarde à 20% dans du tampon acétate sont extraits à deux reprises par 2 ml de solvant. Les phases apolaires sont réunies et analysées au spectrophotomètre, entre 200 et 600 nm.

5.5. Mise en évidence de l'hydroxylation des noyaux phénoliques.

5.5.1. Oxydation de l'aniline.

L'aniline est ajoutée à la pâte de moutarde à raison de 6 mg (0,645 mmol) pour 10 g de pâte. La moutarde est alors oxydée suivant le protocole précédemment décrit (paragraphe II.2.1.), sous pression élevée en oxygène (100 bars). L'oxydation de l'aniline est étudiée à 20 et à 50°C, elle est poursuivie pendant une journée.

5.5.2. Séparation.

Dix grammes de moutarde sont extraits à l'aide de 20 ml d'éther éthylique. L'opération est renouvelée 6 fois. Les différents extraits éthérés sont rassemblés puis évaporés à sec ; le résidu est repris dans 5 ml de méthanol.

5.5.3. Identification des produits d'oxydation.

Les produits d'oxydation de l'aniline sont mis en évidence par chromatographie HPLC.

On utilise un dispositif chromatographique constitué d'une pompe Merck L6200, d'un module de compression radiale Waters équipé d'une colonne C18-10 µm de 10 cm, protégée par une précolonne C18. La détection est assurée par un détecteur à barrette de diodes Merck L3000 monté en série avec un détecteur électrochimique Eldec 103.

La séparation des constituants est effectuée à l'aide d'un solvant Tris-acétate (0,2 mol/l ; pH 8) et contenant 0,75% (v/v) de triéthylamine. Le débit est fixé à 1,5 ml/min. Le détecteur U.V. est réglé à 254 et 280 nm., tandis que la différence de potentiel du détecteur électrochimique est fixée à + 0,65 V afin de faciliter l'identification des trois aminophénols sans être gêné par l'aniline en excès dans le milieu.

Vingt microlitres de la solution méthanolique sont injectés pour l'analyse.

En fixant le potentiel à - 0,05 V, le même solvant permet la mise en évidence du nitrobenzène, éventuellement formé par oxydation directe de l'aniline, mais avec un temps de rétention relativement long (58 min.).

Les temps de rétention des dérivés de l'aniline sont mesurés par rapport à des témoins en solution dans le méthanol

RESULTATS-DISCUSSION

CHAPITRE 1 :
ETUDE DE LA TRANSFORMATION DU DIOXYDE DE SOUFRE. CINETIQUE ET MECANISME D'ACTION DANS LA MOUTARDE.

Nous avons étudié l'auto-oxydation de la moutarde, avec et sans sulfite. Les essais ont été effectués d'une part par polarographie, à l'aide d'une électrode à oxygène, et d'autre part par manométrie, à l'aide d'un respiromètre différentiel (GILSON). Pour ces essais, la moutarde est diluée à 20% (p/v) dans du tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

1. ETUDE DU COMPORTEMENT DES SULFITES AJOUTES A LA MOUTARDE.

1.1. Comparaison entre moutarde sulfitée et non sulfitée.

Nous avons d'abord étudié la différence de comportement entre une moutarde non sulfitée et une pâte commerciale, sulfitée au moment de la fabrication, selon le procédé traditionnel (Concentration en SO_2 libre : 50 ppm).

Les mesures sont effectuées à l'oxygraphe, avec saturation en oxygène dissous dans le milieu. Dans ces conditions, nous avons observé des différences de comportement minimes entre une moutarde sulfitée et non sulfitée (Fig. 20). En effet, la vitesse d'autooxydation est faiblement ralentie dans une moutarde sulfitée, comparativement à une moutarde non sulfitée.

On peut donc supposer que les sulfites ajoutés au moment de la fabrication ont été totalement transformés. Les constituants de la moutarde qui n'auraient pas réagi spontanément avec l'additif seraient alors disponibles pour être oxydés, de la même façon qu'ils le sont dans une moutarde non sulfitée.

1.2. Addition de sulfite à une moutarde non sulfitée.

1.2.1. Addition au cours de l'autooxydation.

Après addition de quantités croissantes de sulfites (de 2,8 à 16,7 mmol/g de moutarde) à une suspension de moutarde non sulfitée, après 20 minutes d'autooxydation, la consommation en oxygène dissous est suivie à l'Oxygraphe. L'absorption est rapide ; elle se développe, dans un premier temps, proportionnellement à la concentration en sulfite

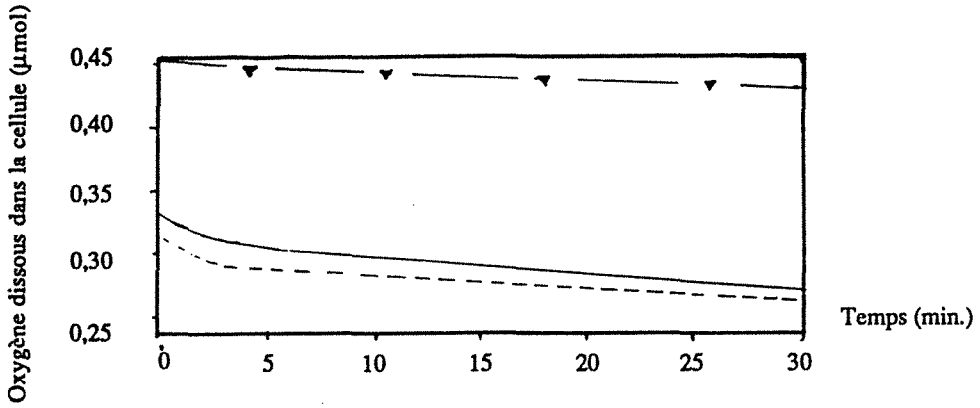


Figure 20 : Consommation en oxygène dissous dans une moutarde non sulfitée et dans une moutarde commerciale (sulfitée à 50 ppm de métabisulfite).

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. Température analyse : 25 °C

———	Moutarde non sulfitée	: 2 ml
	$MnCl_2$ 4 mM	: 25 µl
- - - - - - - - -	Moutarde sulfitée	: 2 ml
	$MnCl_2$ 4 mM	: 25 µl
— ▾ —	Tampon acétate pH 3,5	: 2 ml
	$MnCl_2$ 4 mM	: 25 µl

Moutarde	vitesse initiale (nmol/min./g)	vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde non sulfitée	18,42	4,03
Moutarde sulfitée	15,78	3,22

Tableau 4 : Vitesses de consommation de l'oxygène dans une moutarde fraîche non sulfitée et dans une moutarde sulfitée (Figure 20).

ajouté. Dans la deuxième phase du processus réactionnel, l'oxydation des constituants de la moutarde reste inchangée (Fig. 21).

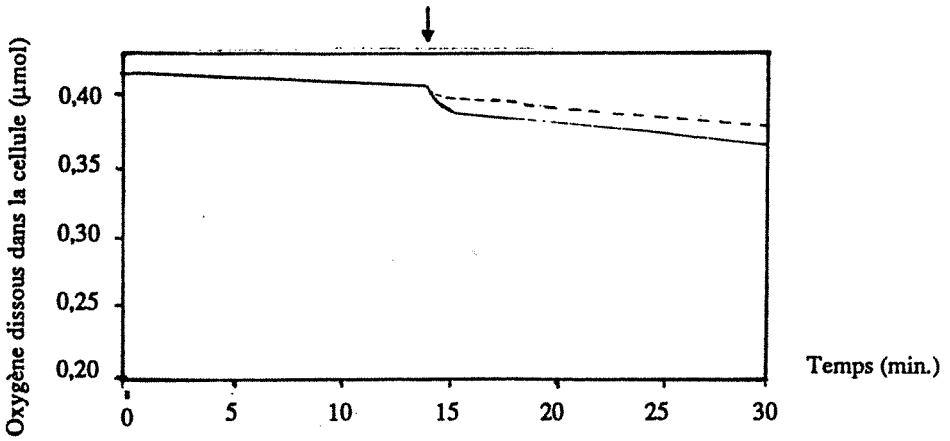


Figure 21 : Effet des sulfites sur l'autooxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. Température analyse : 25 °C

———— Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 µl

- - - - - - - - + sulfite : 1 µmol soit 2,8 µmol de sulfite de sodium/g de moutarde

———— + sulfite : 6 µmol soit 16,7 µmol de sulfite de sodium/g de moutarde

↓ Introduction des sulfites

1.2.2. Addition en début de réaction d'autooxydation (Oxygraphe).

Nous avons renouvelé l'expérience en ajoutant, cette fois, les sulfites au début de la réaction d'auto-oxydation. On n'observe pas, comme dans le cas précédent, de diminution rapide de la teneur en oxygène dissous dans le milieu. La vitesse d'oxydation est pratiquement identique à celle observée avec une moutarde non sulfitée (Fig. 22).

1.2.3. Addition en début de réaction d'autooxydation (Respiromètre).

L'auto-oxydation de la suspension de moutarde est étudiée, dans les mêmes conditions de température et de pH, à l'aide du respiromètre différentiel. Dans ces conditions, l'addition de sulfite entraîne une consommation importante d'oxygène par la suspension (Fig. 23).

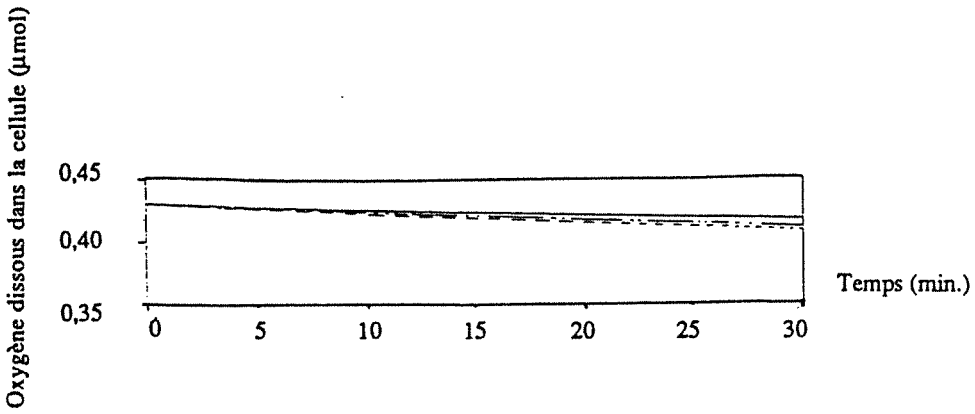


Figure 22 : Auto-oxydation d'une moutarde fraîche non sulfitée, en présence de sulfites, l'additif étant ajouté en début de réaction.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. Température analyse : 25 °C

————	Moutarde	: 0,36 g
	Tampon	: 1,80 ml
	$MnCl_2$ 4 mM	: 25 µl
- - ———	+ sulfite	: 2 µmol (soit 5,6 µmol/g moutarde)
--------	+ sulfite	: 4 µmol (soit 11,1 µmol/g moutarde)

	Vitesse de consommation de l'oxygène (nmol/min./g)
Moutarde fraîche	1,20
Sulfitée à 2 µmol	1,65
Sulfitée à 4 µmol	2,01

Tableau 5 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en sulfite (Figure 22).

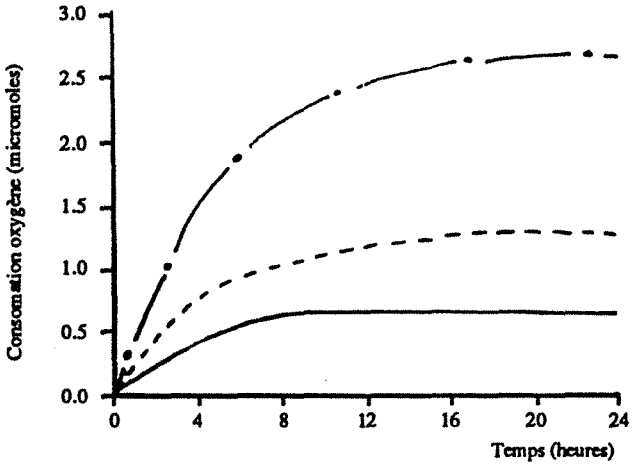


Figure 23 : Auto-oxydation, au respiromètre GILSON d'une moutarde fraîche non sulfitée, en présence de sulfites, l'additif étant ajouté en début de réaction.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. Température 25°C

——— Solution de $NaHSO_3$, 1 mmol/l dans tampon acétate : 5 ml

- - - - - - Suspension de moutarde à 20% (p/v) : 5 ml

— • — Suspension de moutarde à 20% (p/v) : 5 ml
+ $NaHSO_3$ 5 µmol (soit 1 mmol/l)

Les sulfites sont donc rapidement oxydés quand ils sont ajoutés au milieu. L'étude, par respirométrie, du comportement d'une solution de sulfite, à pH 3,8, montre que le SO_2 est partiellement dégradé, avec consommation d'oxygène, suivant la réaction :

$$SO_3^{2-} + 1/2\ O_2 \longrightarrow SO_4^{2-}$$

Les mesures effectuées au respiromètre, en présence d'hydroxyde de potassium à 10% dans le puits central pour piéger le SO_2 dégagé, à pH 3,8, témoignent d'un dégagement gazeux dans les fioles, dégagement qui peut être attribué à SO_2 et aussi à du CO_2 formé en cours d'auto-oxydation des constituants de la moutarde. Le dioxyde de soufre est présent, dans une solution de pH égal à celui de la moutarde (3,8), à la fois sous forme HSO_3^- et SO_2 (ROURE, 1989).

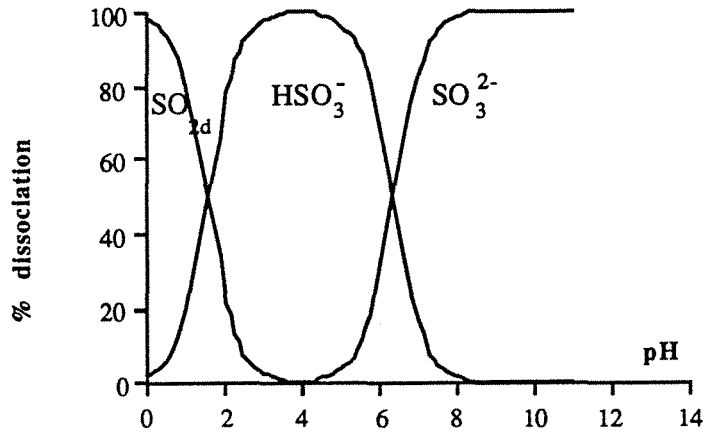


Figure 24 : Formes prédominantes du dioxyde de soufre en fonction du pH.
(D'après ROURE E. et coll., 1989 ; Bios, 20 (8), 45-50.

La mesure, effectuée au palier de la courbe, de la quantité totale d'oxygène consommé permet de constater que la consommation d'oxygène en présence de sulfite (2,6 µmol) est supérieure à la somme des consommations correspondant respectivement à l'auto-oxydation du sulfite en solution à 1 mol/l (0,63 µmol d'oxygène) et à la suspension de moutarde à 20% (p/v) (1,25 µmol d'oxygène).

L'addition du sulfite dans la moutarde se traduit donc par une autooxydation accrue des constituants de la pâte.

Une partie des sulfites ajoutés dans la pâte de moutarde serait donc oxydée directement par l'oxygène de l'air, une deuxième partie serait entraînée sous forme gazeuse tandis que la partie résiduelle pourrait réagir avec les constituants de la moutarde.

1. 2. 4. Conclusions

La comparaison des résultats obtenus avec l'Oxygraphe et le respiromètre permet de conclure à la complémentarité des deux méthodes. A noter cependant, malgré la durée de l'expérimentation, que la respirométrie permet de suivre, indépendamment de l'absorption de O_2 en fonction du temps, le dégagement de CO_2, par piégage dans KOH à 10% (p/v).

1. 3.

Nous avons essayé de mettre en évidence la transformation des sulfites de la suspension de moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate par une autre méthode.

Les sulfites y sont apportés au temps "0", à raison d'une millimole par litre de suspension (soit 0,36 mg/g de moutarde). Les sulfites libres résiduels sont déterminés par une méthode enzymatique (cf. Matériel & Méthodes), à intervalles réguliers au cours des six heures d'oxydation.

Les résultats montrent que le métabisulfite ajouté (I) disparaît rapidement. L'oxydation est pratiquement terminée 1,5 heures après l'addition de l'antioxydant (Fig. 25).

Parallèlement, le pouvoir réducteur de cette même suspension, déterminé par oxydation à l'aide du ferricyanure de potassium à 0,05% (p/v), diminue et passe par un minimum au bout de 1,5 heures. La quantité de produits potentiellement oxydables s'accroît ensuite au cours des cinq heures qui suivent (Fig. 25).

Nous avons pu constater que ces composés réducteurs, vraisemblablement des intermédiaires des réactions de Maillard, n'apparaissent en quantité notable que dans le cas de la moutarde sulfitée. En effet, comparativement à une moutarde non sulfitée, cet essai se traduit par une augmentation du pouvoir réducteur au cours de la même période d'auto-oxydation. La formation de composés réduits est comparativement plus limitée dans la moutarde non sulfitée (Fig. 25).

Le dioxyde de soufre est connu pour inhiber les réactions de Maillard. Il réagit avec les dérivés carbonylés, bases de Schiff (désoxyosuloses, formés au cours du brunissement non enzymatique) pour donner des hydroxysulfonates plus ou moins stables (MAC WEENY, 1981, 1974 ; WEDZICHA, 1986 ; WEDZICHA et VAKALIS, 1988 ; TAYLOR et coll., 1986). Dans ces conditions, les réactions de formation des pigments sont bloquées.

On peut supposer que certaines de ces combinaisons sont instables, ce qui permet d'expliquer un taux constant de SO_2 mesuré dans le milieu, de 0,20 mmol/ml. En effet, JACOBS (1976) a montré, sur des vins rouges, que les sulfites sont oxydés directement par

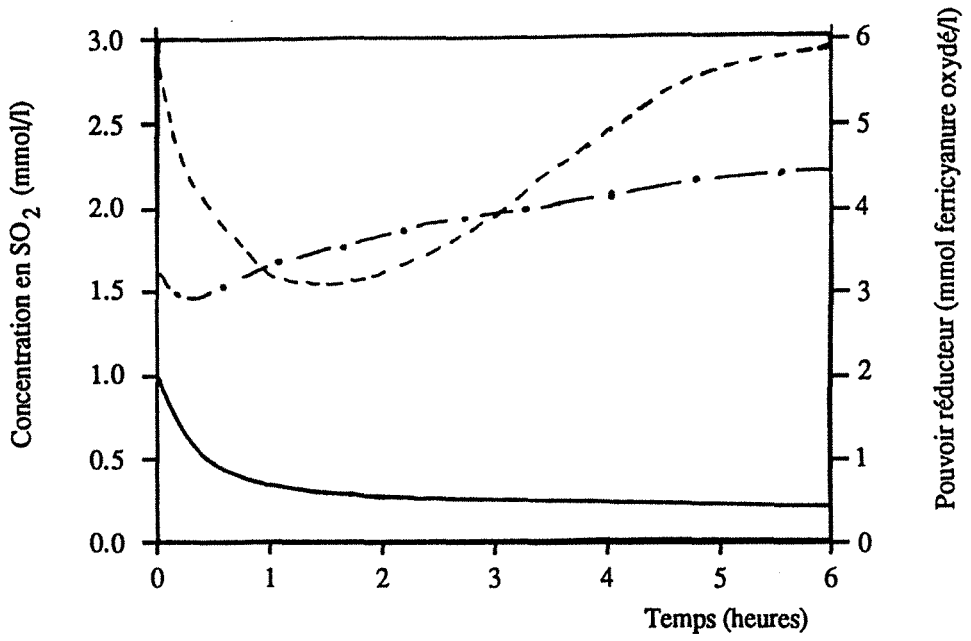


Figure 24 : Devenir des sulfites et évolution simultanée du pouvoir réducteur dans une moutarde fraîchement sulfitée

———— Concentration en sulfite (déterminée par méthode enzymatique)

—— • —— Pouvoir réducteur de la moutarde fraîche (déterminé par rapport au ferricyanure de potassium)

- - - - - - Pouvoir réducteur de la moutarde enrichie en SO_2 (déterminé par rapport au ferricyanure de potassium)

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8, centrifugée à 10 000 g puis filtrée.
Concentration en sulfite ajoutée : 1 mmol/l

l'oxygène, jusqu'à disparition complète d'un des deux protagonistes de la réaction : oxygène ou I. L'oxydation en sulfate conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (II).

$$HSO_3^- + O_2 + H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + H_2O_2 + H^+ \qquad (1)$$

Dans ces conditions, les sulfites peuvent également être partiellement oxydés par H_2O_2 formé ou par les radicaux libres oxygénés correspondants : $O_2^{-\circ}$.

$$HSO_3^- + H_2O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + H_2O + H^+$$

L'oxydation directe des sulfites en présence de O_2 peut également aboutir, par photoactivation, à la formation de radicaux libres $SO_2^{-\circ}$, $SO_3^{-\circ}$, $SO_4^{-\circ}$, $SO_5^{-\circ}$ (HAYON et coll., 1972).

Nous avons pu constater que la disparition du SO_2 dans la suspension de moutarde (Figure 26, Courbe ▲ ▲ ▲) répond, pendant près d'une heure, à une cinétique de type exponentiel, ce qui correspond vraisemblablement, dans ces conditions, à l'oxydation du sulfite ; la courbe exponentielle (en trait plein) témoignant de l'autooxydation des sulfites en solution aqueuse, au même pH.

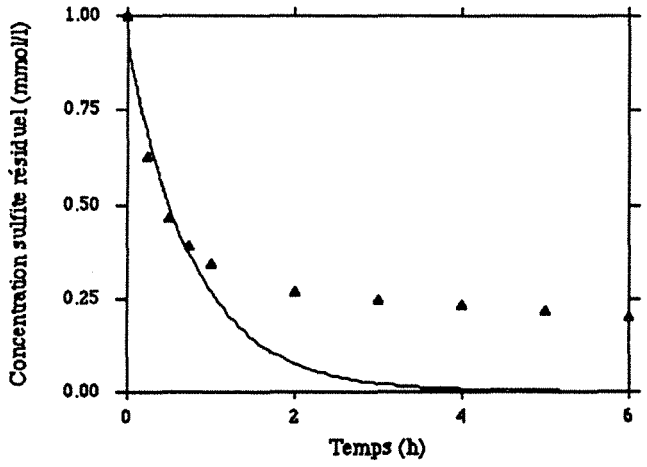


Figure 26 : Devenir des sulfites dans une suspension de moutarde.

▲ ▲ ▲ ▲ Concentration en sulfite résiduel (déterminée par méthode enzymatique)
Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8, centrifugée à 10 000 g puis filtrée.
Concentration en sulfite ajoutée : 1 mmol/l

——— Courbe exponentielle d'autooxydation des sulfites en solution aqueuse à pH 3,8.

La deuxième phase de la réaction, qui se manifeste au bout d'une heure d'autooxydation, traduit la manifestation d'un processus d'inhibition. On peut penser, dans ces conditions, que l'autooxydation du sulfite résiduel est freinée par la formation de produits de condensation entre constituants endogènes de la moutarde et sulfites, à moins qu'il ne s'agisse de substances inhibitrices formées par oxydation couplée des molécules de sulfite avec certains constituants endogènes de la moutarde.

Il aurait été néanmoins opportun de déterminer parallèlement le comportement du système réactionnel vis-à-vis de O_2 dissous pour bien s'assurer que la première phase de la réaction n'est pas imputable, pour l'essentiel, à une réaction de combinaison du sulfite avec certains constituants de la moutarde (dérivés carbonylés, isothiocyanate d'allyle, etc...).

Ces observations nous ont incité à élucider les voies de transformation des sulfites dans la moutarde.

2. ETUDE DES VOIES D'OXYDATION DES SULFITES.

Dans la mesure où l'oxydation en sulfate nécessite la présence d'oxygène, on peut supposer qu'en milieu saturé en oxygène dissous l'auto-oxydation de la suspension de moutarde sulfitée est surtout marquée par cette transformation.

Nous avons en même temps, pour confirmer l'hypothèse, tenté de mettre en évidence, à l'oxygraphe, la formation de peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction.

2. 1. Autooxydation de la moutarde sulfitée en présence de catalase

2.1.1. La vitesse de consommation de l'oxygène dissous est suivie dans une suspension de moutarde fraîchement sulfitée à 5,6 µmol/g (soit 1 mmol/l) et à laquelle on ajoute 3 UI (8,33 UI/g) de catalase, également en début d'auto-oxydation.

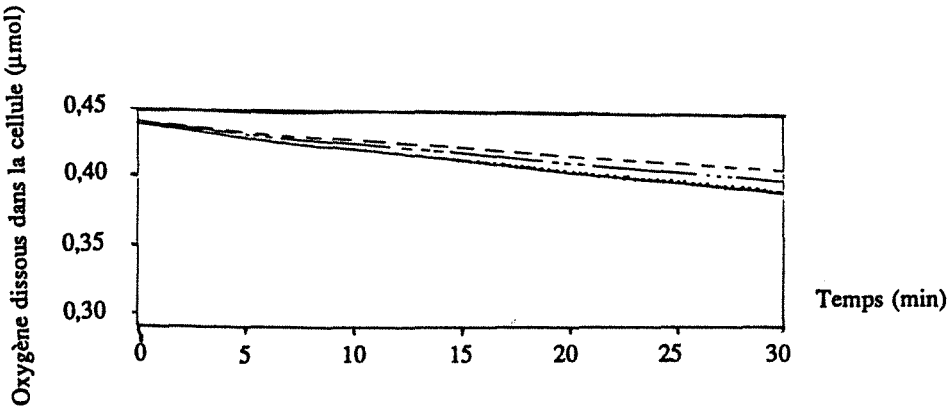


Figure 27 : Influence des sulfites et du système sulfite-catalase sur la vitesse d'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée, les additifs étant ajoutés en début de réaction.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

\- - - - Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM: 25 µl

——- - - Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM: 25 µl
Sulfite : 2 µmol

——— Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM: 25 µl
Catalase : 3 U.I.

..... Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM: 25 µl
Sulfite : 2 µmol
Catalase : 3 U.I.

	Vitesse de consommation de l'oxygène (nmol/min./g)
Moutarde fraîche	3,14
Moutarde + sulfite	4,00
Moutarde + catalase	4,81
Moutarde + sulfite + catalase	4,83

Tableau 6 : Vitesses de consommation d'oxygène dans une moutarde sulfitée ou non sulfitée, en présence ou non de catalase (Figure 27).

Les résultats obtenus sont comparés avec ceux résultant de l'oxydation d'une moutarde non sulfitée, à laquelle on ajoute la même quantité de catalase (3 UI).

La catalase (E.C 1.11.1.6.) catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène.

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{catal}} 2\,H_2O + O_2 \qquad (2)$$

La présence de II dissous dans le milieu réactionnel se traduit à la fois par une diminution de la quantité d'oxygène absorbée ainsi que de la vitesse d'oxydation, par rapport au témoin dépourvu d'enzyme.

L'addition de catalase à la moutarde sulfitée n'entraîne pas de variation significative de la vitesse d'auto-oxydation des constituants de la moutarde. Il ne se forme apparemment pas plus de peroxyde d'hydrogène (Courbe .....) que dans une moutarde non sulfitée (Courbe ———)(Fig. 27).

2.1.2. Dans une autre expérience, I a été ajouté à la suspension de moutarde au cours de la réaction d'autooxydation, au bout de 15 minutes.

La catalase est introduite immédiatement après le sulfite dans la cellule de l'Oxygraphe. Comme pour l'oxydation d'une moutarde sulfitée (Fig. 21), on observe alors une brusque diminution de la concentration on oxygène dissous. Dans ces conditions, les constituants de la moutarde sont apparemment oxydés plus rapidement qu'en présence de sulfites seuls (Fig. 28) bien que la quantité globale d'oxygène absorbé demeure faible.

On peut donc penser que si l'oxydation des sulfites entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène, l'activité de la catalase devrait se traduire par une augmentation de la quantité d'oxygène dissous. Compte tenu de la stoechiométrie de la réaction (1) + (2), cet accroissement ne saurait être supérieur à la moitié de l'oxygène consommé, dans le cas où I est oxydé :

$$HSO_3^- + O_2 + H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + H_2O_2 + H^+ \quad (1)$$

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2\,O_2 \quad (2)$$

$$HSO_3^- + 1/2\,O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + H^+ \quad (3)$$

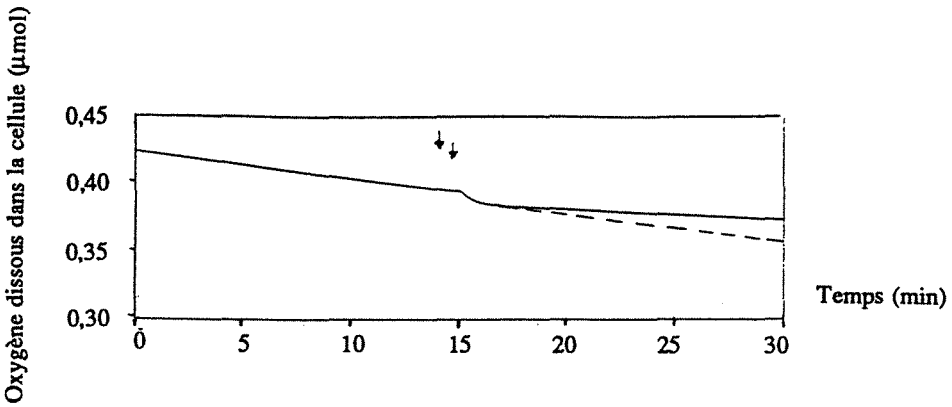


Figure 28 : Effets du sulfite et du système sulfite-catalase sur la vitesse d'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM: 25 µl

———> Introduction du réactif :

——— ———> Sulfite : 2 µmol

- - - - - - - ———> Catalase : 3 U.I. puis
———> Sulfite : 2 µmol

Ces expériences ne nous permettent pas de conclure à la libération de peroxyde d'hydrogène par auto-oxydation rapide des sulfites.

Le fait de ne pas pouvoir mettre en évidence H_2O_2 ne signifie pourtant pas qu'il n'est pas formé au cours de l'oxydation. Il peut, en effet, être rapidement dégradé par la peroxydase endogène de la moutarde.

$$ROOH + AH_2 \xrightarrow{POX} H_2O + ROH + A \qquad \text{Avec } R = H$$

Selon la nature de l'accepteur A, la réaction conduira à des intermédiaires plus ou moins réactifs, voire à des radicaux libres qui peuvent entraîner une dégradation notamment des lipides non saturés (VAMOS-VIGYAZO, 1981).

On peut citer, à titre d'exemple, l'oxydation des phénols en quinones (SCHREIER et MILLER, 1985 ; MILLER et SCHREIER 1985) dans la pomme (RICHARD et NICOLAS, 1989) et l'avocat (VANLELYVELD et coll., 1984).

Ces réactions pourraient alors contribuer à augmenter le pouvoir réducteur d'un milieu tel que la moutarde fraîchement sulfitée (fig. 25). Les produits formés ont toutes les chances ensuite de participer à des réactions de polycondensation avec formation, à terme, de pigments bruns.

Une autre voie de dégradation possible du peroxyde d'hydrogène peut conduire à la formation de radicaux libres oxygénés. Cette réaction, appelée réaction de Fenton, fait intervenir les cations de métaux lourds et notamment le fer ((Fe(II)), présent dans la moutarde (VANGHEESDALE & coll, 1977).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\circ$$

En partant de cette observation, nous avons tenté de mettre en évidence la formation de radicaux libres à partir du peroxyde d'hydrogène rajouté à la moutarde.

2. 2. Utilisation de systèmes générateurs de peroxyde d'oxygène

L'utilisation d'un système générateur de peroxyde d'hydrogène dans le milieu devrait permettre d'apporter des informations sur la voie de transformation des sulfites dans la moutarde. C'est la raison pour laquelle nous avons ajouté à la moutarde non sulfitée de la glucose-oxydase (E.C. 1.1.3.4.).

2.2.1. La consommation d'oxygène par le système moutarde-glucose oxydase est mesurée à l'Oxygraphe. Grâce au glucose présent dans la moutarde, on observe une diminution importante de la concentration en oxygène dissous (Fig. 29, Courbe —— - - -).

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconolactone} + H_2O_2$$

L'introduction de catalase (2 UI) dans le milieu réactionnel entraîne un accroissement significatif de la quantité d'oxygène dissous (Courbe ——▲). Cet accroissement traduit la décomposition d'une quantité équivalente de **II** formé au cours de l'action de la GOD sur le glucose endogène.

Il est important de remarquer que la différence entre la quantité théorique d'oxygène libéré par la dégradation de **II** (Courbe ·····) et la quantité d'oxygène réellement libéré au cours de la réaction (Courbe —— ▲) représente une certaine quantité d'oxygène. Cette quantité d'oxygène correspond à la fraction de H_2O_2 qui a servi à oxyder les constituants de la moutarde, par l'intermédiaire d'une activité peroxydasique imputable à la peroxydase endogène.

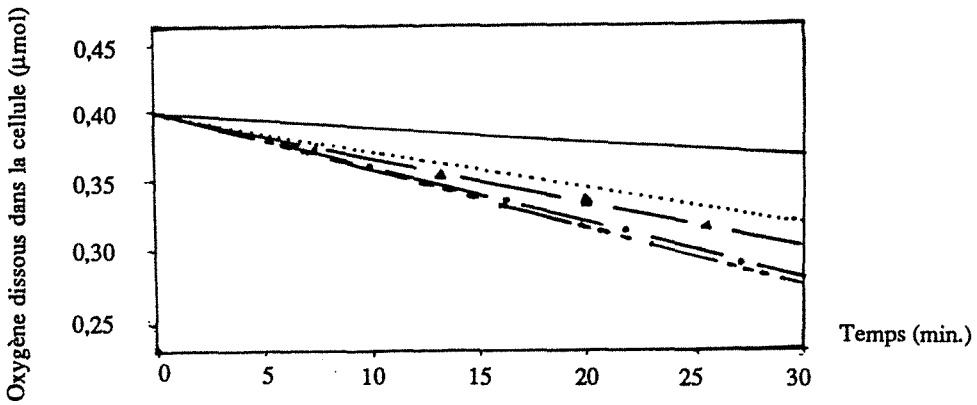


Figure 29 : Effet de la glucose oxydase et du système glucose oxydase-catalase sur une moutarde non sulfitée fraîche.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. Température analyse : 25 °C

——— Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 ml

——▲ Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 ml
Glucose oxydase : 150 U.I.
Catalase : 2 U.I.

— — — Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 ml
Glucose oxydase :150 U.I.

——• Moutarde : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 ml
Glucose oxydase :150 U.I.
Catalase : 6 U.I.

..... Courbe théorique de consommation d'oxygène, en présence de GOD et de catalase (en supposant qu'une mole de H2O2 formé libère une demi-mole d'oxygène.)

	Vitesse de consommation de l'oxygène (nmol/min./g)
Moutarde	2,78
Moutarde + Glucose-oxydase	11,58
Moutarde + GOD + catalase (2 UI)	8,69
Moutarde + GOD + catalase (6 UI)	10,83

Tableau 7 : Vitesses de consommation de l'oxygène dans une moutarde non sulfitée, en présence du système GOD/catalase (Figure 29).

Ajoutons que lorsque la concentration en catalase est plus élevée, (6 UI), l'activité catalytique de la catalase se traduit par un effet peroxydasique, au détriment de la dégradation de II en oxygène moléculaire.

2. 2. 2. Pour compléter cette information sur les propriétés peroxydasiques manifestées par la catalase, pour des concentrations élevées en enzyme, l'expérience a été suivie sur respiromètre. Le rapport GOD/catalase a été volontairement inversé par rapport à l'expérience précédente.

Comme avec l'Oxygraphe, l'addition dans la fiole de glucose oxydase entraîne une consommation importante d'oxygène (Fig. 30). La présence de catalase à 195 UI/g de moutarde se traduit par un effet peroxydasique. Cette activité est par ailleurs confirmée par le brunissement sensible observé tant dans la fiole du respiromètre que dans la cellule de l'Oxygraphe, en présence de catalase.

2. 3. Moutarde enrichie en peroxyde d'hydrogène

Nous avons ensuite observé le comportement d'une moutarde non sulfitée, enrichie en peroxyde d'hydrogène. H_2O_2 est rajouté directement à la cellule de l'Oxygraphe, à raison de 2 µmol dans la cellule (soit 5,6 µmol/g de moutarde).

Dans ces conditions, on n'observe pas de variation significative dans la consommation d'oxygène par la moutarde (Fig. 31).

On peut penser que le peroxyde d'hydrogène rajouté sert de cosubstrat à la peroxydase de la moutarde pour oxyder certains constituants spécifiques. La faible consommation d'oxygène observée dans ces conditions ne peut être considérée comme le processus réactionnel dominant.

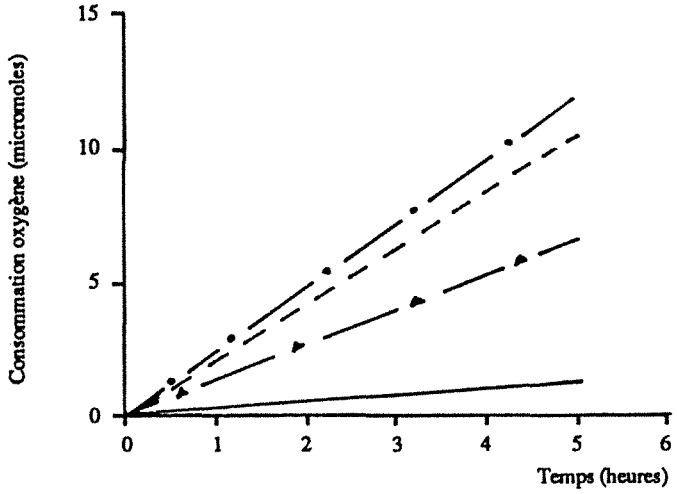


Figure 30 : Effet de la glucose-oxydase (GOD) et du système (GOD-catalase) sur l'absorption d'oxygène d'une moutarde non sulfitée, mesurée au respiromètre différentiel GILSON.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.Température analyse : 25 °C

————	Moutarde	: 5 ml
- - - - - - - - -	Moutarde GOD	: 5 ml : 16 UI/ml (soit 44 UI/g moutarde)
—— • ——	Moutarde GOD Catalase	: 5 ml : 16 UI/ml (soit 44 UI/g moutarde) : 70 UI/ml (soit 195 UI/g moutarde)
——▲——	Courbe théorique de consommation d'oxygène en présence de GOD et de catalase (si une mole d'H_2O_2 générée par la GOD conduit à la formation d'une demi mole d'O_2)	

	Vitesse de consommation de l'oxygène (mmol/h/g.)	Vitesse de consommation de l'oxygène (nmol/min/g.)
Moutarde	0,32	4,44
Moutarde + GOD	2,36	39,26
Moutarde + GOD + catalase	2,67	44,44

Tableau 8 : Vitesses de consommation de l'oxygène (Figure 30)

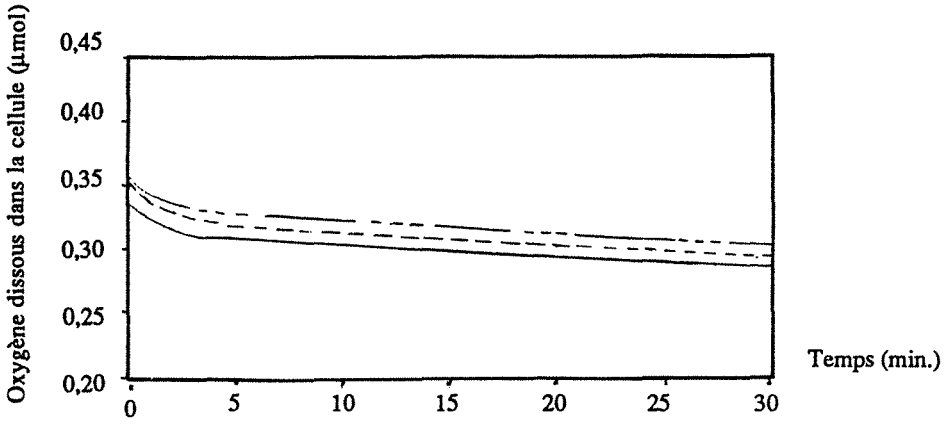


Figure 31 : Effet de H_2O_2 sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l. Température analyse : 25 °C

_____ Moutarde : 2 ml

_ _ _ _ Moutarde : 2 ml
H_2O_2 : 1 µmol soit 2,8 µmol/g.

_ _ _ _ Moutarde : 2 ml
H_2O_2 : 2 µmol soit 5,6 µmol/g.

Un autre processus est susceptible, néanmoins, de participer à la transformation non enzymatique du peroxyde d'hydrogène rajouté. En effet, en présence d'ions ferreux, II est dégradé suivant la réaction de Fenton :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\circ$$

Les radicaux OH° peuvent ensuite contribuer efficacement à l'oxydation non spécifique des constituants de la moutarde.

Bien que nous ne l'ayons pas vérifié, la consommation d'oxygène à vitesse faible mais constante (Fig. 31) pourrait traduire la manifestation d'un processus oxydatique catalysé par le fer ferreux.

Dans ce contexte, l'action des sulfites sur Fe^{3+} peut se traduire par la formation de Fe^{2+} selon l'équation :

$$SO_3^{2-} + 2\,Fe^{3+} + H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + 2\,Fe^{2+} + 2H^+$$

Le système redox Fe (II)- Fe (III) peut alors intervenir en tant que catalyseur de transfert d'électrons dans l'autooxydation des constituants organiques par l'oxygène moléculaire.

La détermination du fer total, par spectrophotométrie d'absorption atomique, sur moutarde sulfitée et sur moutarde non sulfitée, conduit dans les deux cas à des concentrations en fer dans la moutarde de 9,6 mg par kg d'extrait sec (cf. Chapitre 3).

La détermination du fer ferreux par la méthode à la bathophénantroline (cf. Matériel et Méthodes) ne nous a pas permis d'obtenir des résultats quantitativement représentatifs. Cela est d'autant plus regrettable sachant qu'il aurait été intéressant d'apprécier comparativement l'incidence des réducteurs tels que sulfite, acide ascorbique ou glutathion sur l'équilibre Fe (II) <——> Fe (III).

En résumé, cette étude a permis de confirmer que la moutarde non sulfitée est l'objet d'un processus d'oxydation, en présence d'oxygène moléculaire.

Le processus d'autooxydation de la moutarde semble mettre en oeuvre à la fois un système peroxydasique endogène, en même temps que l'action catalytique des cations de métaux lourds, en particulier du fer ferreux. Les substrats participant à ces réactions sont vraisemblablement de nature multiple, mais il y a tout lieu de penser que les composés phénoliques et les substances réductrices sont à l'origine des pigments bruns qui caractérisent une moutarde auto-oxydée.

Les résultats montrent également que lorsqu'on ajoute à ce milieu des sulfites dans un but de protection, une partie de ces derniers est transformé en SO_2 gazeux tandis qu'une fraction est fixée à des structures chimiques spécifiques (vraisemblablement des dérivés carbonylés), cependant qu'une autre partie est oxydée par l'oxygène moléculaire. Ces réactions conduisent à la génération de radicaux libres, avec ou sans formation transitoire de peroxyde d'hydrogène.

En présence de sulfite, la quantité d'oxygène consommée par la moutarde est supérieure à la quantité d'oxygène correspondant à l'oxydation du sulfite lui-même. L'excédent d'oxygène absorbé a donc servi à oxyder certains constituants de la moutarde. Inversement, nous avons pu montrer que les constituants de la moutarde exercent un effet inhibiteur sur l'autooxydation du sulfite.

D'autre part, cette oxydation couplée des constituants de la moutarde, sous l'effet de l'autooxydation des sulfites, se traduit par la manifestation d'un pouvoir réducteur accru vis-à-vis du ferricyanure de potassium.

Ce processus d'oxydation est, indirectement, responsable du brunissement de la moutarde auto-oxydée. Pour étayer cette observation, nous avons pu montrer que le peroxyde d'hydrogène libéré *in situ*, par l'intermédiaire d'une réaction oxydasique catalysée par la glucose-oxydase, en présence d'oxygène, est accompagné d'un brunissement caractéristique de la moutarde.

C'est la raison pour laquelle il est opportun d'approfondir la nature des effets de l'oxydation, d'une part sur les composés phénoliques endogènes et, d'autre part sur les intermédiaires des réactions de Maillard.

Ces observations nous ont amenés à rechercher d'autres substances pouvant avoir une action inhibitrice sur l'autooxydation des constituants de la moutarde. Parmi les plus efficaces, nous avons notamment retenu les extraits de thé vert et de romarin, les produits d'Amadori, certains composés phénoliques, l'acide ascorbique et l'EDTA.

CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'EFFET DE DIFFERENTS ADDITIFS EN VUE DE LEUR UTILISATION A LA PLACE DES SULFITES DANS LA PATE DE MOUTARDE.

Afin de remplacer les sulfites en tant qu'inhibiteur des processus d'autooxydation dans la moutarde, nous avons étudié l'efficacité d'un certain nombre de substances connues pour leurs propriétés antioxygènes.

En effet, outre les effets néfastes sur la conservation, observés précédemment, la législation de certains pays tels que l'Italie ou les Etats-Unis tend à limiter voire supprimer l'emploi des sulfites comme additifs alimentaires.

Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'action de différents constituants à l'égard de l'autooxydation de la moutarde.

Outre la protection de la moutarde et la conservation de ses propriétés organoleptiques, l'utilisation des antioxydants en tant qu'inhibiteurs d'autooxydation permet également d'étudier les constituants de la moutarde impliqués dans l'oxydation.

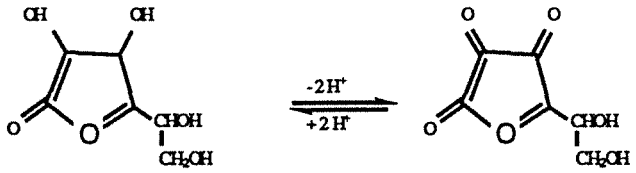
Pour cela, nous avons suivi l'effet inhibiteur d'un certain nombre d'antioxydants sur l'absorption d'oxygène par la moutarde, à l'Oxygraphe, dans les mêmes conditions que pour l'étude du comportement des sulfites (moutarde à 20 % (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 - 0,05 mol/l).

Nous avons choisi d'étudier les effets de l'acide ascorbique, de composés phénoliques simples (catéchine, épicatéchine, morine, alpha-tocophérol, trihydroxybutyrophénone), de certains chélateurs des métaux lourds, des acides aminés et de certains extraits végétaux : extraits de thé vert et de romarin. Ces différents composés sont, suivant les expériences, utilisés seuls ou en association synergique entre eux.

1. EFFETS DE L'ACIDE ASCORBIQUE SUR L'AUTOOXYDATION DES CONSTITUANTS DE LA MOUTARDE.

1.1. Généralités

L'acide ascorbique est fréquemment utilisé comme antioxydant dans la mesure où il cède facilement ses électrons à l'oxygène. Toutefois, son activité antioxydante dépend beaucoup de la nature du milieu à protéger. Efficace en milieu lipidique, son action est controversée en milieu aqueux où il se comporte selon la concentration en inhibiteur ou en prooxydant.



Toutefois, sous forme estérifiée (palmitate d'ascorbyle), il peut contribuer, en raison de la solubilité en milieu lipidique à une protection efficace contre le rancissement des huiles et des graisses (SAPERS et HICKS, 1989).

Son efficacité pour lutter contre le brunissement enzymatique des denrées alimentaires a fait l'objet de nombreux travaux, notamment dans le domaine des fruits et des jus qui en résultent (LATTANZIO & coll., 1989 ; SANTERRE & coll., 1988 ; SAPERS et HICKS, 1989).

1.2. Etude de l'autooxydation de l'acide ascorbique.

1.2.1. A l'aide de l'Oxygraphe.

L'étude des effets de l'acide ascorbique ajouté à une moutarde non sulfitée a été poursuivie à l'aide de l'Oxygraphe, avec une suspension de moutarde à 20 % (p/v) en tampon acétate pH 3,8.

Dans ces conditions, on n'observe pas de consommation accrue d'oxygène lors de l'addition de cet additif à raison de 5,6 µmol/g moutarde, ce qui traduit une autooxydation très lente de l'acide ascorbique (Figure 32).

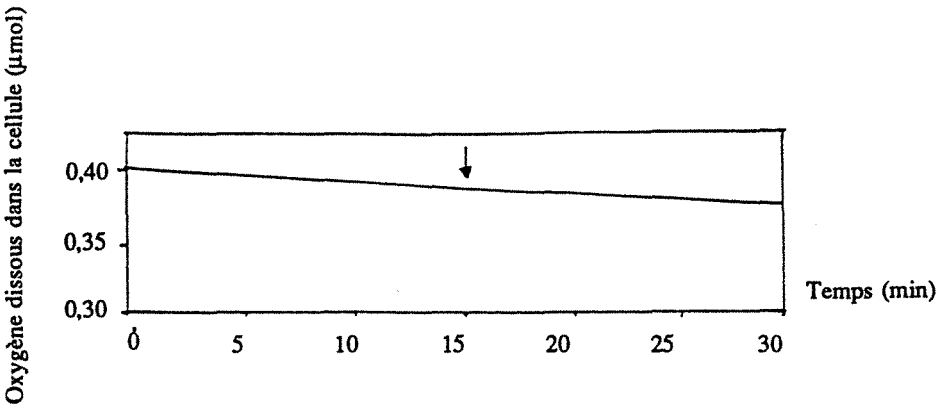


Figure 32 : Effet de l'acide ascorbique sur l'autooxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde : 2 ml

↓ Introduction de l'acide ascorbique : 2 mmol (soit 5,6 mmol/g)

1.2.2. Mesure au respiromètre.

Néanmoins, l'étude de la consommation d'oxygène par la même suspension de moutarde, à l'aide du respiromètre différentiel GILSON, montre que la quantité d'oxygène absorbé par la moutarde enrichie en acide ascorbique est supérieure à la quantité absorbée par la moutarde seule (Figure 33).

Ce comportement rend compte de l'autooxydation de l'acide ascorbique, catalysée vraisemblablement par les cations de métaux lourds (Cu^{2+}, Fe^{2+}) de la moutarde.

$$\text{Acide ascorbique} + O_2 \xrightarrow{Fe2+,\ Cu2+} \text{Acide déhydroascorbique} + H_2O_2$$

En revanche, la mesure de la quantité d'oxygène absorbé au respiromètre, nécessaire pour oxyder l'acide ascorbique seul, en présence d'ions Cu^{2+}, tend à montrer que, dans la moutarde, l'acide ascorbique n'est pas oxydé en totalité. Dans la moutarde enrichie en acide ascorbique, la vitesse de consommation en oxygène ainsi que la quantité globale de O_2

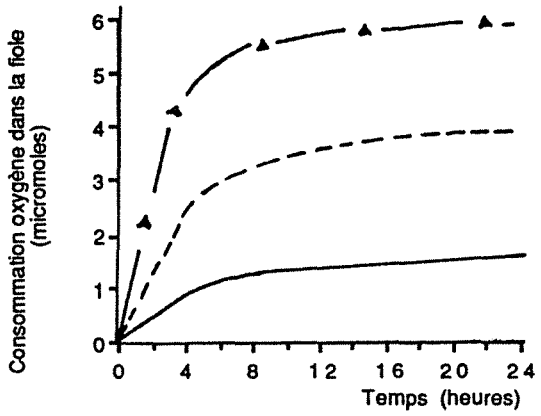


Figure 33 : Effets de l'acide ascorbique sur l'absorption d'oxygène par une moutarde non sulfitée, mesurée à l'aide du respiromètre GILSON.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde : 5 ml

▲ —— Acide ascorbique seul : { Acide ascorbique : 5 mmol ; Tampon acétate pH 3,8 : 5 ml ; $CuSO_4$ 0,02 mol/l :

----- Moutarde et acide ascorbique { Moutarde : 5 ml ; Acide ascorbique : 5 mmol

	Vitesse de consommation de l'oxygène (nmol/min/g)	Quantité consommée après 24 h (nmol/g)
Moutarde	4,0	27,8
Moutarde + Ac. ascorbique	11,1	11,1
Acide ascorbique	27,8	4,0

Tableau 9 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en acide ascorbique (Figure 33)

absorbé sont, en effet, intermédiaires entre celles de la moutarde seule et celles correspondant à l'acide ascorbique.

1.3. Etude du devenir de l'acide ascorbique ajouté à la moutarde.

Nous avons suivi l'oxydation de l'acide ascorbique dans la suspension de moutarde à 20°C pendant 6 heures d'oxydation.

L'évolution de la concentration en acide ascorbique est suivie à l'aide d'une méthode ampérométrique (cf Matériel et Méthodes). On observe, dans ces conditions, une diminution régulière de sa concentration pendant les six heures d'autooxydation (Figure 34).

La détermination simultanée du pouvoir réducteur fait apparaître une diminution des constituants potentiellement oxydables, liée à la disparition partielle de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique a lui-même une structure semblable à celle des réductones, douées de pouvoir réducteur. Il peut, grâce à cette structure, intervenir dans les réactions de brunissement non enzymatiques. D'autres produits de dégradation de l'acide ascorbique, comme l'acide 2,3 dicétogulonique, peuvent se condenser pour donner des produits bruns.

Les produits formés, de la même famille que les mélanoïdines, sont eux aussi doués de pouvoir réducteur. Leur formation compenserait en partie la diminution de la concentration en acide ascorbique et expliquerait le ralentissement dans la diminution du pouvoir réducteur.

Une partie de l'acide ascorbique est oxydée par l'oxygène moléculaire. Le peroxyde d'hydrogène libéré peut être générateur de radicaux oxygénés (MAHONEY et GRAF, 1986 ; DONNELLY et coll., 1989). Les conditions d'oxydation dépendent essentiellement du pH et de l'activité de l'eau du milieu (MAHONEY et GRAF, 1986 ; UEDA et coll., 1986 ; KANNER et SHAPIRA, 1989). L'oxydation est catalysée par les métaux de transition, Cu^{2+}, Fe^{2+}.

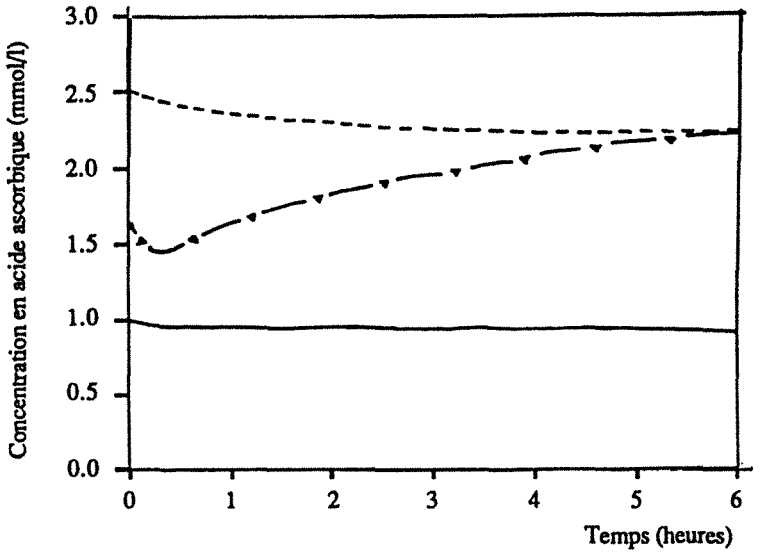


Figure 34 : Evolution du pouvoir réducteur et de la concentration résiduelle en acide ascorbique dans la moutarde fraîche enrichie en acide ascorbique.

———— Concentration en acide ascorbique (en mmol/l, déterminée par potentiométrie)

— ▼ — Pouvoir réducteur de la moutarde fraîche (en mmol d'équivalents acide ascorbique/l, déterminé par rapport au ferricyanure de potassium).

- - - - - - - Pouvoir réducteur de la moutarde enrichie en acide ascorbique (en mmol d'équivalents acide ascorbique/l, déterminé par rapport au ferricyanure de potassium).

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8, centrifugée à 10 000g puis filtrée.
Concentration en acide ascorbique ajouté : 1 mmol/l

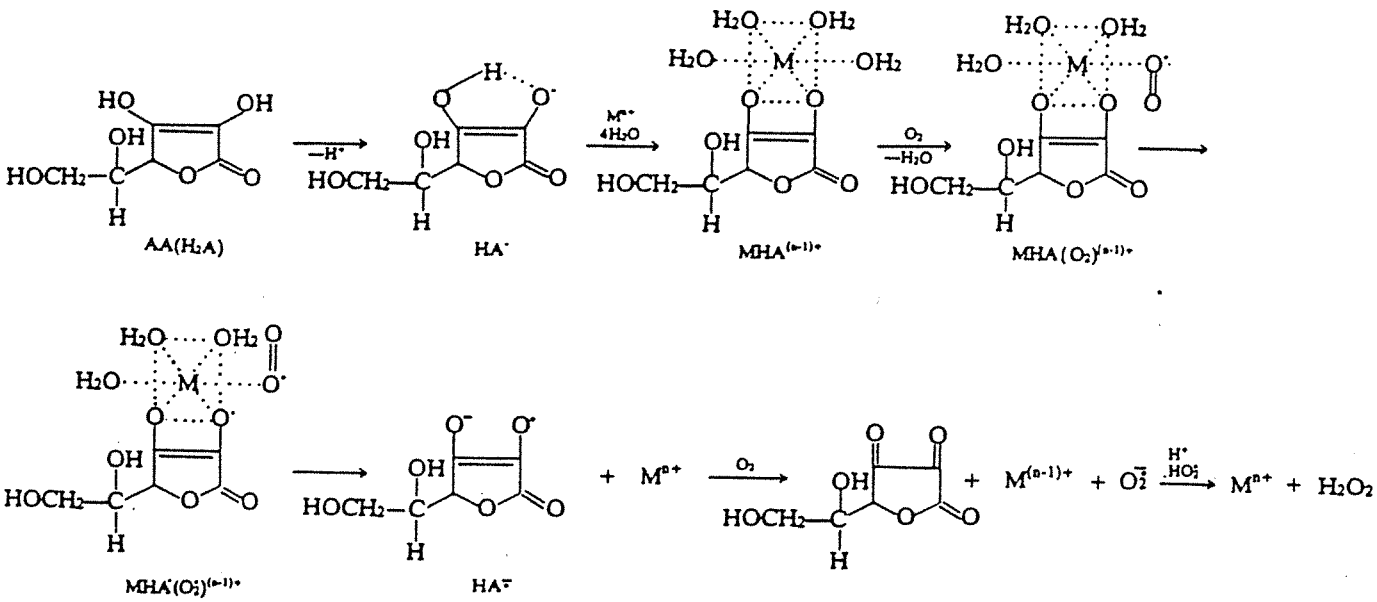


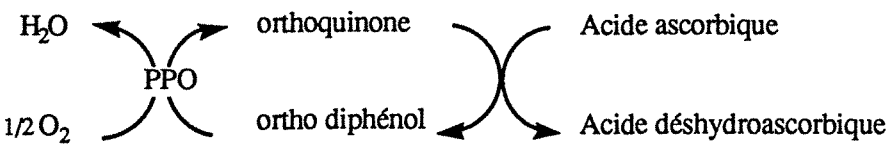
Figure 35 : Mécanisme de l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique, catalysée par les cations de métaux lourds ($M^{n+} = Fe^{2+}, Cu^{2+}$)

La structure électronique de l'acide ascorbique favorise également le passage de l'oxygène d'un état triplet à un état singulet. Dans ces conditions, l'oxygène singulet pourra, à son tour, oxyder d'autres substrats spontanément peu sensibles à l'oxygène (KANNER et SHAPIRA, 1989).

Les réactions faisant intervenir l'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène peuvent conduire indirectement à l'oxydation des lipides et du β carotène.

La deuxième voie de transformation ne nécessite pas, comme l'ont montré les résultats au respiromètre, la présence d'oxygène. L'additif est oxydé par certains constituants de la moutarde.

Une partie peut, par exemple, être transformée au cours de la régénération des phénols à partir de semiquinones (TONO et coll., 1989)



Selon HAYASHI & coll (1981 a, b, 1983), l'acide déhydroascorbique formé au cours de la réaction d'oxydation peut se condenser avec une molécule d'acide aminé. Il peut

alors donner lieu à un processus radicalaire de polycondensation qui débouche sur la formation de pigments jaunes, puis bruns.

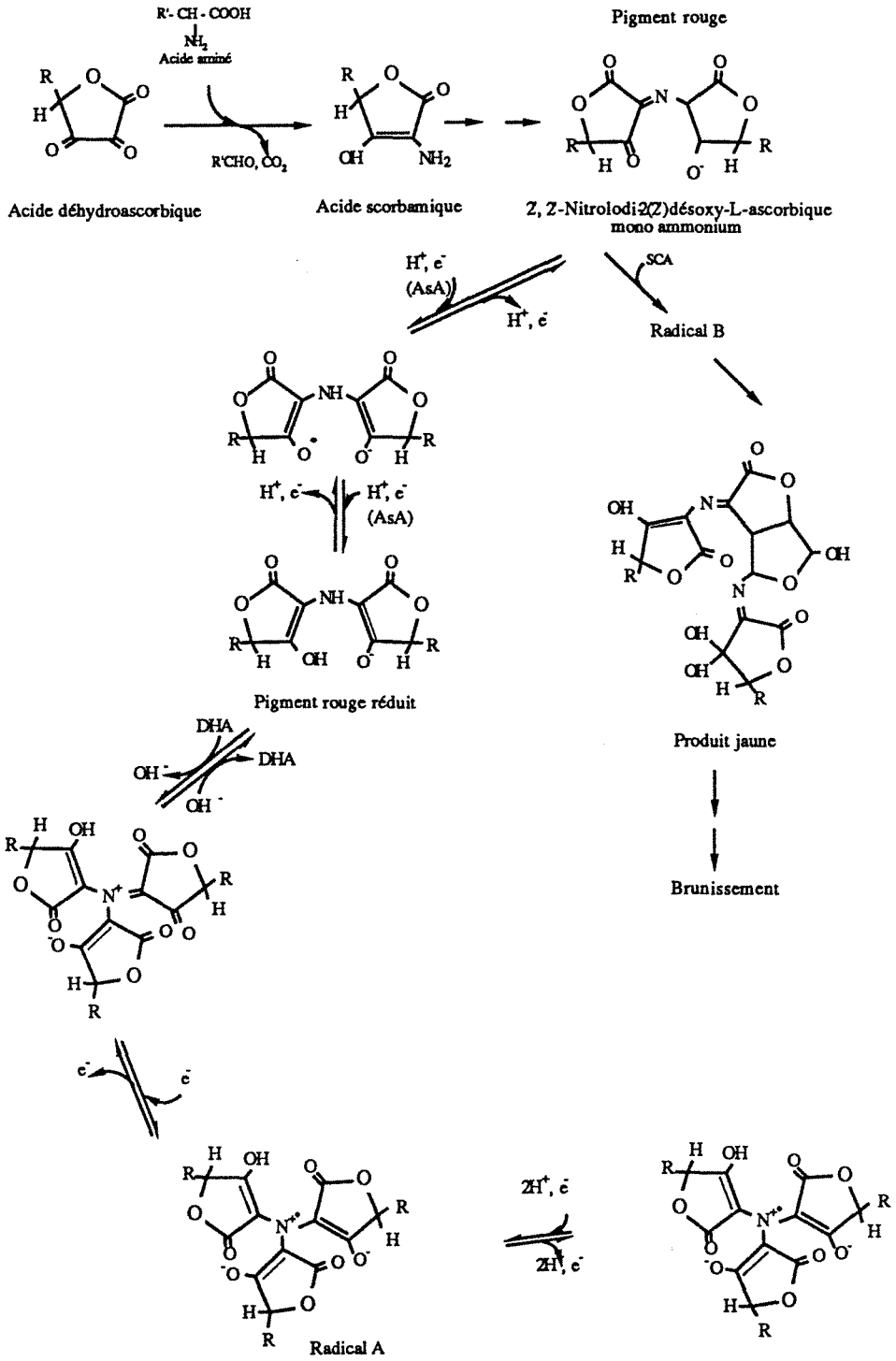


Figure 36 : Réaction de condensation de l'acide déhydroascorbique avec les acides aminés (d'après HAYASHI et coll., 1983)

Les réactions d'oxydation de l'acide déhydroascorbique conduisent, elles aussi, à des produits bruns générateurs de faux goûts (SAWAMURA et coll., 1989 ; HANDWERK et COLEMAN, 1988 ; LEE et NAGY, 1988 ; KACEM et coll., 1987 a, b : KANNER et coll., 1982).

Selon MAHONEY et GRAF (1986), l'acide ascorbique, à forte concentration possède un effet antioxydant. En revanche, à des concentrations plus faibles, l'acide ascorbique est rapidement oxydé en présence de quantités catalytiques de métaux lourds avec génération de radicaux libres. Dans ces conditions, on observe un couplage entre l'oxydation propre de l'acide ascorbique et celle de constituants difficilement autooxydables : c'est l'effet pro-oxydant qui prédomine.

L'acide ascorbique, en milieu aqueux, n'est donc pas un bon antioxydant ; en effet, quelle que soit la quantité initiale ajoutée, le processus oxydatif débouchera sur des concentrations résiduelles telles que l'effet prooxydant sera privilégié.

Dans la moutarde, l'activité antioxydante de l'acide ascorbique n'a pas pu être mise en évidence. Son oxydation lente en composés impliqués, à long terme, dans un processus de brunissement de la pâte (acide 2,3 dicétogulonique notamment) ne permet pas d'envisager son utilisation comme antioxydant.

L'acide ascorbique peut être également utilisé en synergie avec d'autres antioxydants tels que les tocophérols (DZIEZAK, 1986).

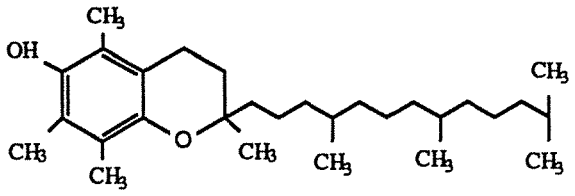
2. TOCOPHEROLS

Nous avons expérimenté l'efficacité de l'α-tocophérol, seul puis en association avec l'acide ascorbique, sur l'auto oxydation d'une pâte de moutarde.

2.1. α-tocophérol

Les tocophérols sont présents dans de nombreux végétaux. Parmi les formes naturelles, nous avons choisi d'utiliser l'alpha-tocophérol qui, bien que présentant l'activité

antioxydante la plus faible comparativement aux autres isomères (β,γ,δ), est en même temps le plus fréquent.

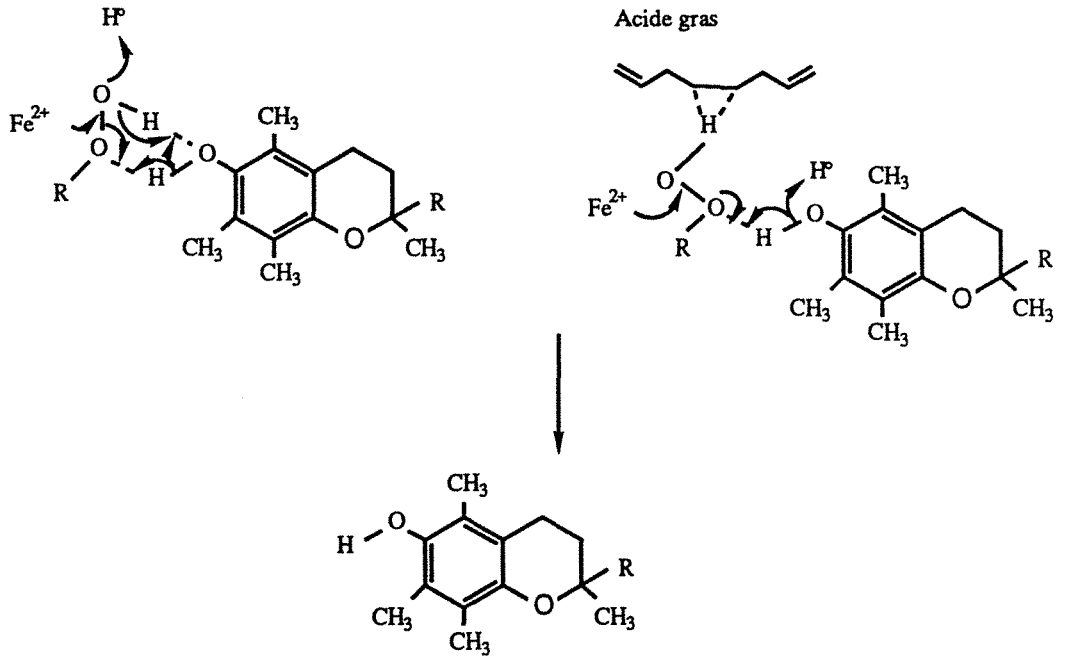


Alpha tocophérol

Les tocophérols ralentissent l'oxydation des lipides en bloquant les réactions radicalaires. Selon RAO (1982), ils forment des liaisons hydrogène avec certains donneurs d'électron et en particulier les hydroperoxydes lipidiques (POKORNY & coll., 1989).

La dégradation spontanée des complexes formés conduit à la formation de tocophéryl quinone et d'un mélange de dimère et trimère de tocophérol. On assiste parallèlement à la libération, à partir de l'hydroperoxyde, de l'alcool correspondant. Cette dégradation spontanée est limitée.

En présence de Fe^{2+}, le complexe est décomposé sans modification de la structure du tocophérol (NAKANO & coll, 1980).



+ROH

$+OH^-$ (Fe^{2+})

POKORNY & coll (1989), ont également montré l'effet des métaux lourds sur la décomposition du complexe hydroperoxyde - tocophérol.

Selon NAKANO & coll (1980), indépendamment du groupement phénol, la chaîne latérale de la molécule de tocophérol semble jouer également un rôle dans la prévention de l'oxydation des lipides.

Outre la décomposition du complexe hydroperoxyde - tocophérol, les ions Fe^{2+} interviennent dans la formation de radicaux libres, selon la réaction de Fenton.

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\circ$$

Ils participent également à la formation de quinones et du dimère (FUJITANI et ANDO, 1981). La formation des quinones nécessite la mise en oeuvre de deux molécules de tocophérol pour deux molécules d'hydroperoxyde.

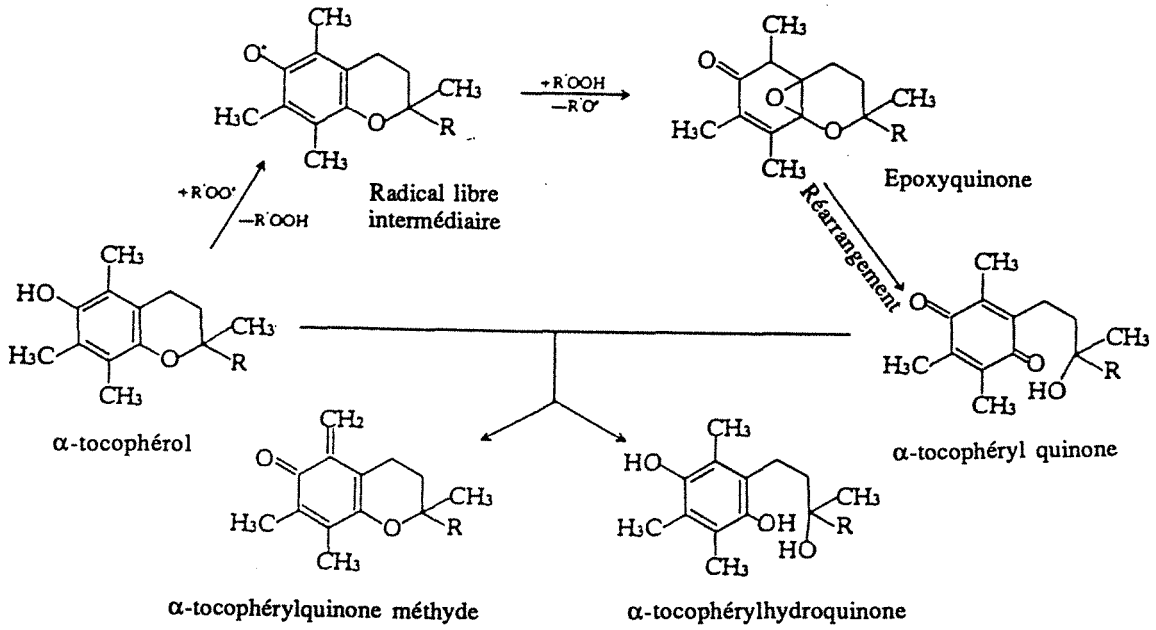


Figure 37 : Formation de quinones par réaction entre hydroperoxydes lipidiques et alpha-tocophérol.

En revanche, la dimérisation fait intervenir la participation de deux molécules de tocophérol par molécule d'hydroperoxyde. Selon POKORNY et coll (1989), c'est cette réaction qui est prédominante, comme le montrent les énergies d'activation des différentes réactions. Cette réaction est, d'autre part, favorisée par les ions Cu^{2+}. Les dimères ont

également des propriétés antioxydantes, OSAWA (1989) en a isolé à partir de feuilles de *Prunus*.

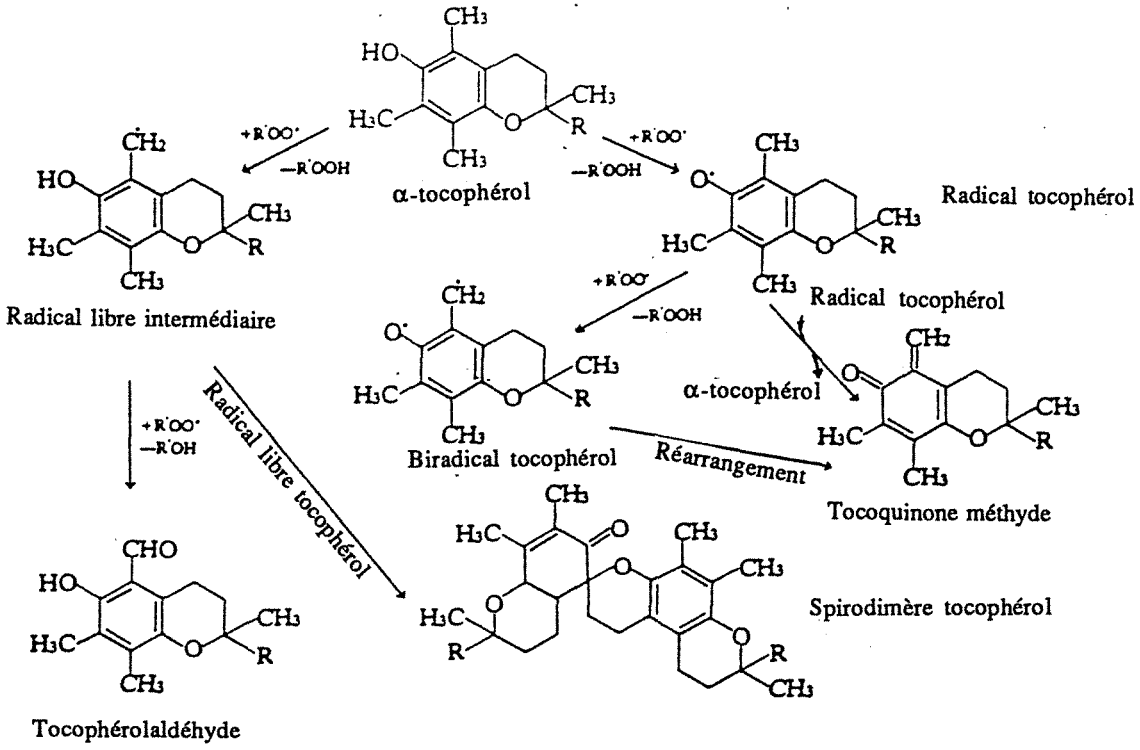


Figure 38 : Réactions de l'alpha-tocophérol avec les hydroperoxydes lipidiques.
Dimérisation des tocophérols.

CILLARD et coll. (1980), par ailleurs, ont montré que l'activité antioxydante des tocophérols est liée à leur concentration dans le milieu réactionnel. A forte concentration en milieu aqueux, c'est l'effet prooxydant qui prédomine.

Un effet antioxydant peut cependant être obtenu, même à concentration plus élevée, quand l'additif est associé à un antioxydant fort : B H T, cystéine, acide ascorbique par exemple (CILLARD et CILLARD, 1986). Cet effet peut être attribué à la chélation des métaux prooxydants, à la régénération des tocophérols (CILLARD et CILLARD, 1986 ; RICHARD, 1986) ou à la dégradation des hydroperoxydes (REINTON et ROGSTADA, 1981). Les nombreux travaux de AOYAMA & coll. (1991) visent également à reconnaître les propriétés antioxydantes des associations synergiques entre tocophérols et acides aminés, ou encore tocophérols et extraits d'épices (clou de girofle, café, entre autres).

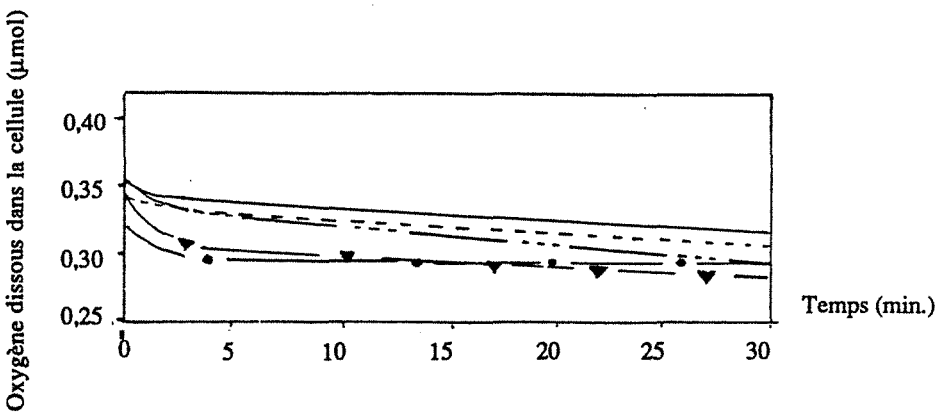


Figure 39 : Effet de l'alpha-tocophérol sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

———— Moutarde seule : 2 ml

——— ▼ Moutarde : 2 ml
α-tocophérol : 5 µmol (soit 13,9 µmol/g)

— • — Moutarde : 2 ml
α-tocophérol : 12,5 µmol (soit 34,7 µmol/g)

- - - - - - - - Moutarde : 2 ml
α-tocophérol : 25 µmol (soit 69,4 µmol/g)

— — — Moutarde : 2 ml
α-tocophérol : 50 µmol (soit 139 µmol/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	18,5	2,58
Moutarde + tocophérol 5 µmol	48,9	1,28
Moutarde + tocophérol 12,5 µmol	35,2	0,97
Moutarde + tocophérol 25 µmol	9,3	2,50
Moutarde + tocophérol 50 µmol	21,1	3,78

Tableau 10 : Vitesses de consommation de l'oxgène par la moutarde enrichie en tocophérol (Figure 39).

L'addition d'alpha-tocophénol dans la cellule de l'Oxygraphe, à raison de 69,5 µmol/g de moutarde, se traduit par un effet négatif sur le ralentissement de l'autooxydation. Cet effet semble traduire le fait que l'α-tocophérol à la concentration choisie se comporte en prooxydant (Figure 39).

2.2. α-tocophérol en synergie avec l'acide ascorbique.

L'utilisation de l'acide ascorbique en synergie avec l'α-tocophérol n'entraîne pas de modification du régime d'autooxydation de la moutarde (Figure 40). Dans le milieu étudié, l'acide ascorbique en générant des radicaux libres ascorbyles pourra entraîner la formation de radicaux tocophéryles. Dans ces conditions, une dimérisation de l'antioxydant aurait pour effet de diminuer la proportion d'alpha-tocophérol susceptible de réagir avec les hydroperoxydes lipidiques.

Ce résultat est toutefois en contradiction avec celui de CILLARD et CILLARD (1986), sur l'inhibition de l'effet prooxydant des tocophérols par l'acide ascorbique. C'est pourquoi, dans ce contexte, il n'est pas exclu que les composés lipidiques ne représentent pas, dans le cas de la moutarde, les substrats les plus facilement autooxydables.

Le manque d'efficacité de l'alpha-tocophérol nous a conduit à rechercher d'autres antioxydants pour la protection de la moutarde.

3. COMPOSES PHENOLIQUES

3. 1. Etude des propriétés antioxydantes de quelques phénols simples.

Les phénols sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés anti oxydantes (JERUMANIS et coll., 1980 ; DELAVEAU et VIDAL-TESSIER, 1986 ; AESCHBACH et coll., 1986...).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'effet de certains flavonoïdes sur la vitesse d'autooxydation de la suspension de moutarde à 20 % (p/v).

La D (+) Catéchine, la L (-) Epicatéchine et la Morine sont utilisées à des concentrations comprises entre 0 et 278 µmol/g de moutarde.

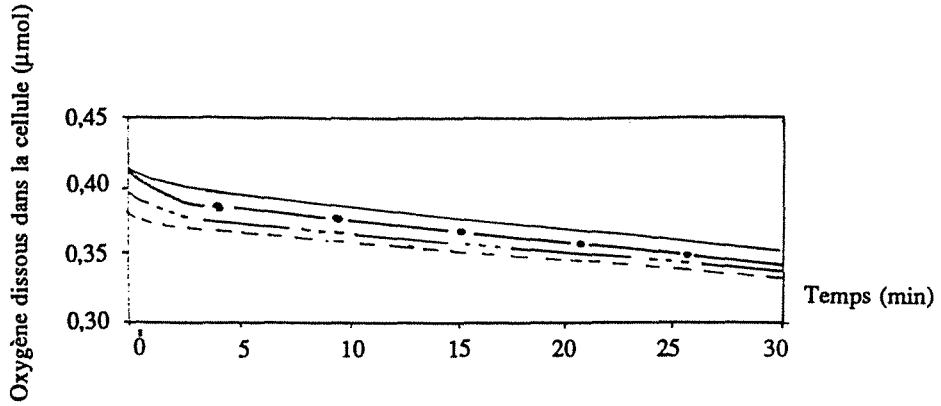


Figure 40 : Effet de l'alpha-tocophérol, en synergie avec l'acide ascorbique sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

_____ Moutarde seule : 2 ml

_ _ _ _ Moutarde : 2 ml
α-tocophérol : 5 µmol (soit 14 µmol/g)
Acide ascorbique : 25 µmol (soit 69 µmol/g)

_ _ _ Moutarde : 2 ml
α-tocophérol : 25 µmol (soit 69 µmol/g)
Acide ascorbique : 25 µmol (soit 69 µmol/g)

_ • _ Moutarde : 2 ml
Acide ascorbique : 25 µmol (soit 69 µmol/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	3,5	4,8
Moutarde + Acide ascorbique (AA)	17,5	4,2
Moutarde + tocophérol 5 µmol + AA	15,3	3,5
Moutarde + tocophérol 25 µmol + AA	18,0	5,0

Tableau 11: Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en tocophérol et en acide ascorbique (Figure 40).

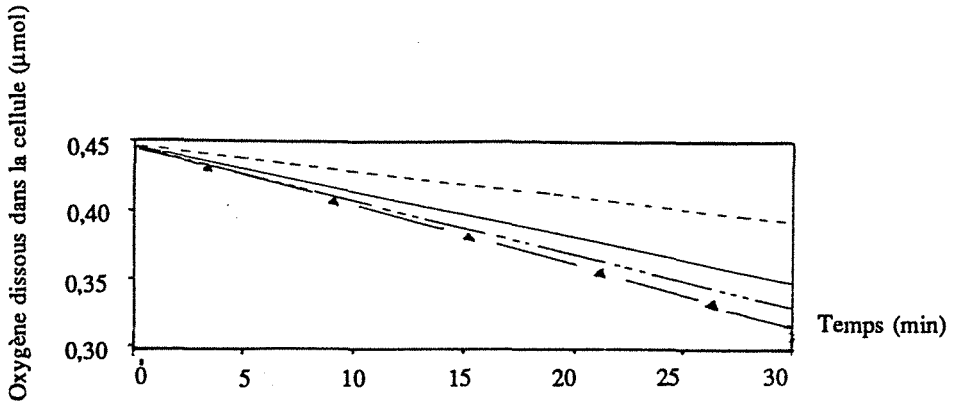


Figure 41 a : Effet de la D (+) catéchine sur la prévention de l'autooxydation de la moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde non sulfitée : 2 ml

—— – – Moutarde non sulfitée : 2 ml
D-(+)-Catéchine : 12,5 µmol (35 µmol/g soit 10 mg/g)

– – – – Moutarde non sulfitée : 2 ml
D-(+)-Catéchine : 43 µmol (120 µmol/g soit 35 mg/g)

——— ▲ Moutarde non sulfitée : 2 ml
D-(+)-Catéchine : 100 µmol (278 µmol/g soit 80 mg/g)

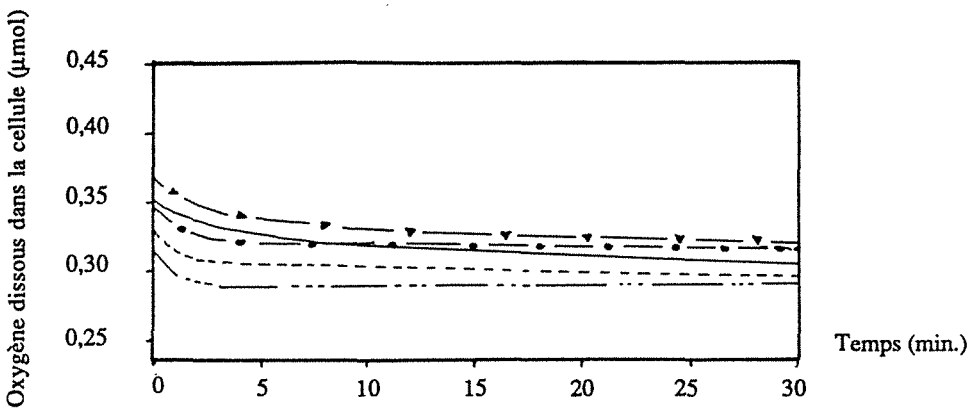


Figure 41 b : Effet de la L (-) épicatéchine sur la prévention de l'autooxydation de la moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde : 2 ml

———▲ Moutarde : 2 ml
Catéchine : 50 µmol (139 µmol/g)

– – – – Moutarde : 2 ml
Epicatéchine : 12,5 µmol (35 µmol/g (10 mg/g))

—— – – Moutarde : 2 ml
Epicatéchine : 50 µmol (139 µmol/g (40 mg/g))

——— ◆ Moutarde : 2 ml
Epicatéchine : 100 µmol (278 µmol/g (80 mg/g))

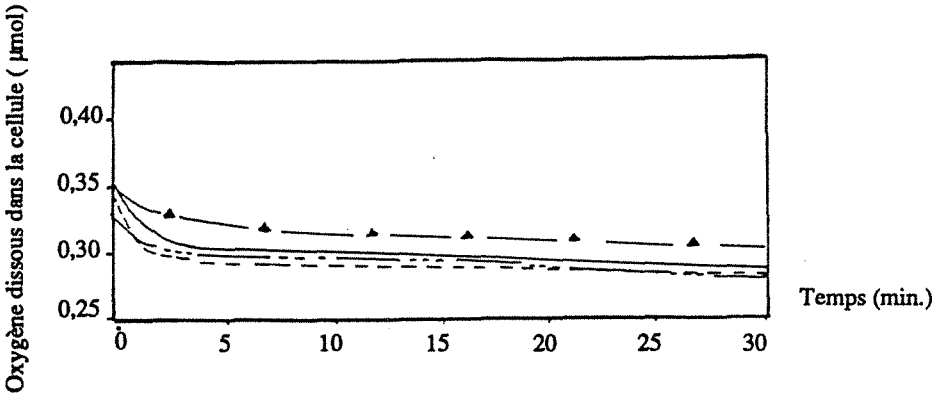


Figure 41 c : Effet de la Morine sur la prévention de l'autooxydation de la moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

—— Moutarde : 2 ml

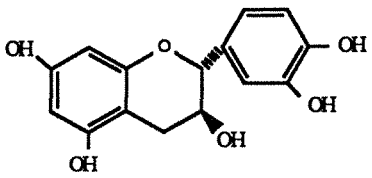
– – – Moutarde : 2 ml
Morine : 12,5 µmol (35 µmol/g (10 mg/g))

—▲ Moutarde : 2 ml
Catéchine : 50 µmol (139 µmol/g (40 mg/g))

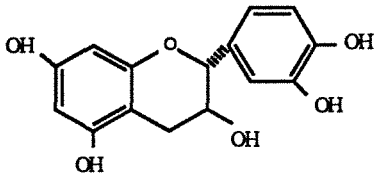
---—— Moutarde : 2 ml
Morine : 50 µmol (139 µmol/g (42 mg/g))

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	9,1	/
Moutarde + Catéchine 10 mg	10,9	/
Moutarde + Catéchine 35 mg	5,2	/
Moutarde + Catéchine 80 mg	11,9	/
Moutarde seule	20,8	2,0
Moutarde + Epicatéchine 10 mg	34,7	1,2
Moutarde + Epicatéchine 40 mg	26,1	0,6
Moutarde + Epicatéchine 80 mg	43,3	0,3
Moutarde + Catéchine 80 mg	28,5	1,8
Moutarde seule	51,2	1,3
Moutarde + Morine 10 mg	63,7	1,0
Moutarde + Morine 42 mg	37,5	1,3

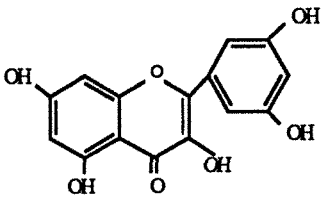
Tableau 12: Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde non sulfitée enrichie en phénols (Catéchine, Epicatéchine, Morine) (Figures 41).



D (+) Catéchine



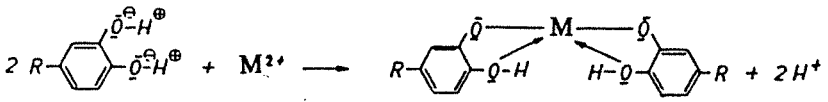
L (-) Epicatéchine

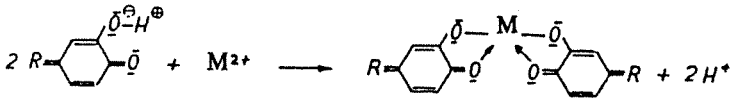


Morine

La D-(+)-Catéchine, comparativement à la L-(-)-Epicatéchine, entraîne une diminution notable de la consommation d'oxygène par la moutarde (Figures 41). L'effet maximum est obtenu avec 125 mmol de Catéchine (soit 36 g) par kg de moutarde, ce qui n'est pas réaliste. Il s'agit toutefois d'un antioxydant naturel existant dans de nombreux végétaux ; son utilisation pourrait être envisagée en synergie avec un autre inhibiteur.

On peut penser que son activité antioxydante est en grande partie due à la chélation des métaux lourds, selon la réaction :





Parmi les flavonoïdes, c'est la Quercétine (flavonol) qui malgré sa faible solubilité possède l'effet chélatant le plus marqué, dans la mesure où elle présente un groupement (3'-4') orthodiphénol et un groupement (3-4) hydroxy cétonique.

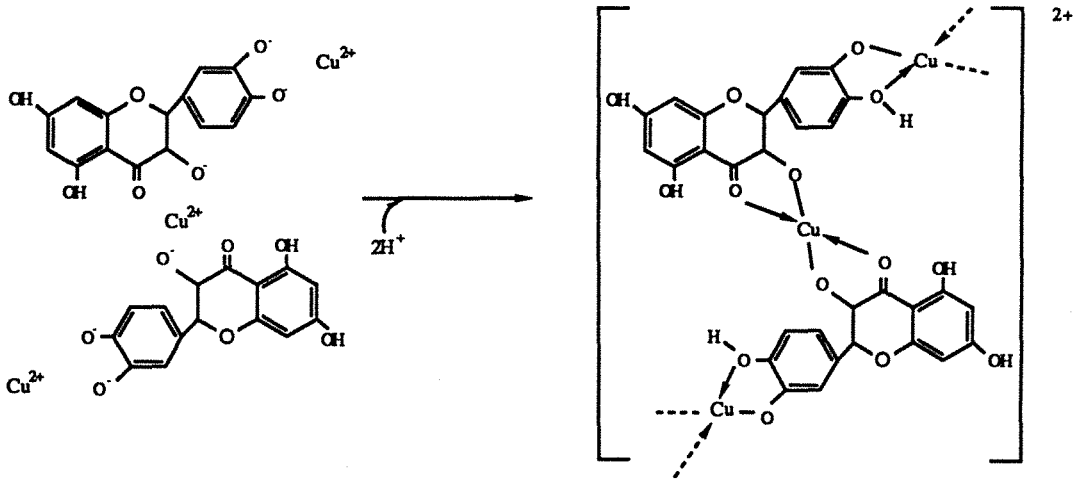
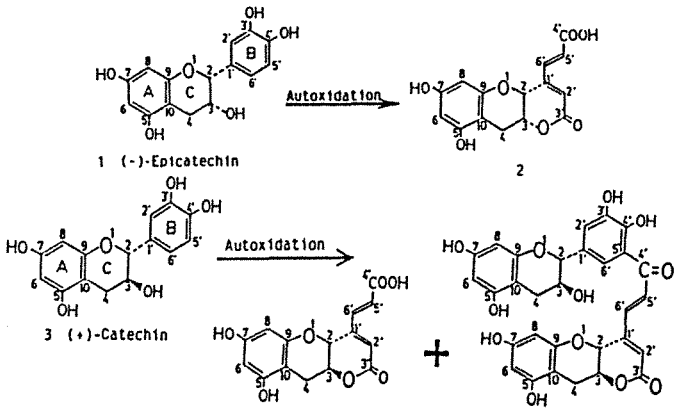


Figure 42 : Mécanisme de chélation des cations métalliques (Cu^{2+}) par la quercétine.

Les flavonoïdes interviennent également en bloquant les réactions radicalaires. ROBAK et GRYGLEWSKI (1988) ont montré qu'il s'agissait de chélatants forts, qui inhibent la première étape du processus de peroxydation. Les flavonoïdes agissent en effet en bloquant les anions superoxydes. Ces effets ont été observés notamment avec les flavanes et les flavanols, qui sont tous deux des produits d'oxydation des catéchines.

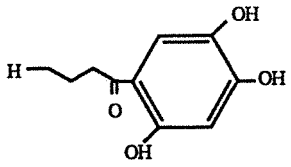
HIROSE et coll. ont tenté récemment d'élucider le mécanisme d'oxydation de la Catéchine (1990 a) et de l'Epicatéchine (1990 b), au cours des réactions d'inhibition, par ces phénols, de l'autooxydation des lipides. Ces auteurs ont pu, par RMN du ^{13}C, identifier les produits de réaction suivants.



La poursuite de l'oxydation conduit à la formation de produits de polycondensation et au brunissement enzymatique.

3. 2. Trihydroxybutyrophénone

Nous avons expérimenté l'efficacité de la 2, 4, 5, trihydroxybutyrophénone.



2,4,5 trihydroxybutyrophénone

Ce composé, extrait de l'ail, est un antioxydant naturel ; son action est comparable à celle de la quercétine.

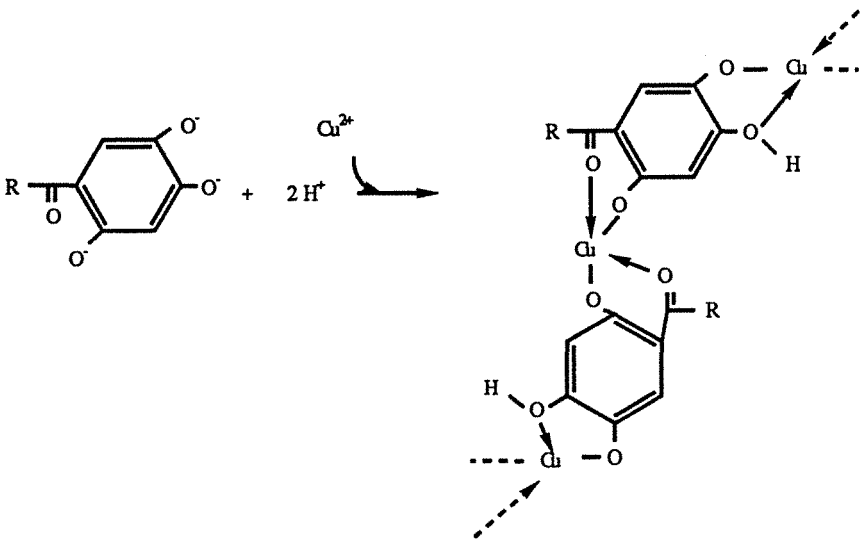


Figure 43 : Mécanisme d'action de la 2,4,5 THBP

L'addition de 0 à 139 µmol/g de trihydroxybutyrophénone à la pâte de moutarde entraîne une diminution notable de la vitesse de consommation d'oxygène. Toutefois, une telle concentration n'est guère envisageable dans la pratique (Figure 44).

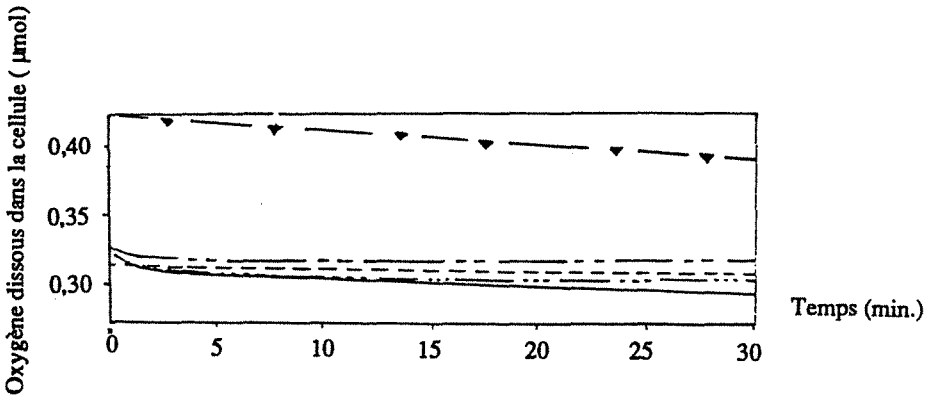


Figure 44 : Effet de la trihydroxybutyrophénone sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde seule :2 ml

——▼ THBP seule: 25 µmol dans 2 ml de Tampon acétate pH 3,8 : 2 ml

——... Moutarde : 2 ml
THBP : 25 µmol (69 mg/g)

– – – – – Moutarde : 2 ml
THBP : 37,5 µmol (104 mg/g)

——– – Moutarde : 2 ml
THBP : 50 µmoll (139 mg/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	% inhibition	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde	23,22	/	1,87
Moutarde + TBHP 25	23,22	0%	1,03
Moutarde + TBHP 37,5	0,86	96%	0,86
Moutarde + TBHP 50	10,92	53%	0,44
TBHP seule	3,19	/	/

Tableau 13 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en trihydroxybutyrophénone (Figure 44).

4 . CHELATANTS DES IONS METALLIQUES

La participation des cations de métaux lourds (Cu^{2+}, Fe^{2+}) aux processus oxydatiques d'oxydoréduction et de formation de radicaux libres oxygénés à l'oxydation des constituants de la moutarde est un fait bien établi. Par ailleurs, il convient de remarquer que ces cations entrent dans la constitution de la structure des groupements prosthétiques des oxydases, PPO et POD, en grande partie responsables des processus de brunissement enzymatique (VAMOS-VIGYAZO, 1981).

C'est pourquoi il était opportun d'expérimenter et de définir l'efficacité d'autres agents chélatants que les polyphénols.

4.1. EDTA

L'E D T A est l'un des chélatants les mieux connus et les plus utilisés pour complexer les cations de métaux lourds. Malheureusement, son emploi fait l'objet de restrictions, la législation française étant à son égard très réticente.

KANNER et SHAPIRA (1989) ont montré en effet que l'EDTA inhibe le brunissement non enzymatique et l'oxydation de l'acide ascorbique dans les jus d'agrumes, ce qui confirme en même temps l'importance de la participation des cations de métaux lourds aux processus oxydatiques.

Son addition dans la cellule de l'Oxygraphe à des concentrations comprises entre 0 et 0,30 µmol/g de moutarde n'a pas entraîné de ralentissement de la vitesse d'autooxydation de la moutarde (Figure. 45).

L'effet positif de l'EDTA est normalement obtenu pour des valeurs de pH voisines de la neutralité, pour lesquelles les groupements carboxyliques de l'agent chélatant sont pleinement dissociés.

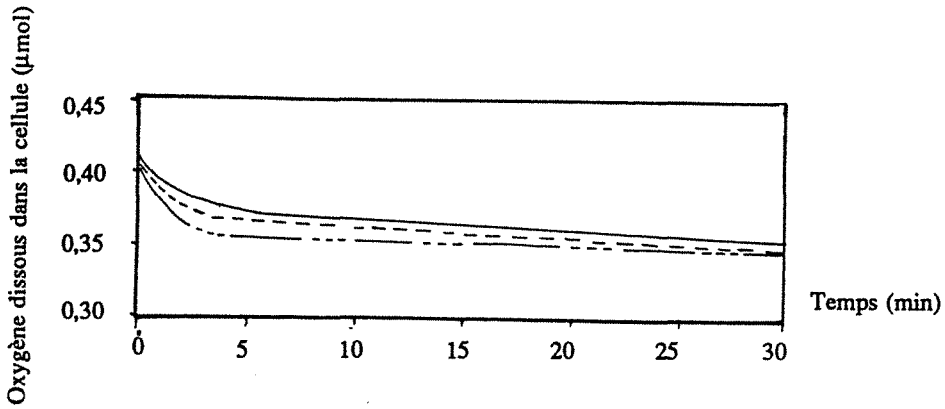


Figure 45 : Cinétique d'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée, en présence d'EDTA.

Suspension de moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

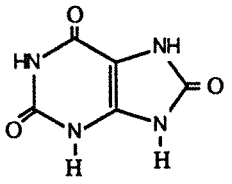
———	Moutarde	: 2	ml	
– – – – –	Moutarde	: 2	ml	
	EDTA	: 20	µg	soit 55,6 µg/g moutarde
– – ——	Moutarde	: 2	ml	
	EDTA	: 40	µg	soit 111 µg/g moutarde

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	40,4	2,25
Moutarde + EDTA 20µg	54,7	2,06
Moutarde + EDTA 40µg	57,4	0,94

Tableau 14 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en EDTA (Figure 45).

D'autre part, la chélation entraîne une complexation du cation, pas forcément le masquage de sa réactivité. En effet, dans le cas du fer (III), GRAF et coll. (1983), MAHONEY et GRAF (1986) ont montré que la solubilité et le potentiel redox du complexe Fe^{3+} - EDTA sont supérieurs à ceux du fer seul. Tout se passe comme si l'effet prooxydant de Fe^{3+} était accru. KOPPENOL (1985) a également mis en évidence l'effet prooxydant du complexe Fe (II) -EDTA qui contribue à la formation de radicaux hydroxyles OH° à partir de H_2O_2.

4. 2. Acide urique



L'acide urique se comporte en agent chélatant des ions Fe^{2+} (DAVIES & coll., 1986). Les urates inhibent l'oxydation de l'acide ascorbique et l'oxydation des lipides induite par l'acide ascorbique à la suite de la formation de complexes stables avec les cations de métaux lourds : Fe^{2+} et Fe^{3+} en particulier. De plus, l'acide urique est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+}.

L'acide urique peut agir selon un autre mécanisme. Il est oxydé en allantoïne au cours d'un processus radicalaire qui tend à piéger les radicaux OH°, ascorbyle ainsi que les radicaux hydroperoxydes lipidiques et l'oxygène à l'état singulet ($^1O_2$), ce qui a pour effet de limiter la peroxydation des lipides (AMES & coll., 1981 ; DAVIES & coll., 1986).

L'action de l'acide urique, ajouté dans la cellule de l'Oxygraphe à raison de 35 à 278 µmol d'acide urique par gramme de moutarde, se traduit par un effet inhibiteur légèrement positif (Figure 46).

Afin de vérifier le caractère antiradicalaire de l'acide urique, nous avons tenté d'ajouter à la même suspension de moutarde une quantité définie de glucose-oxydase, afin de générer, *in situ*, la formation de radicaux libres oxygénés et de peroxyde d'hydrogène.

Dans ces conditions, l'acide urique ne manifeste plus d'effet inhibiteur. Les radicaux libres générés par l'action de la GOD semblent ne pas être piégés. On peut donc en conclure que l'effet inhibiteur précédemment observé dépend davantage de propriétés chélatantes de l'acide urique à l'égard des cations métalliques plutôt que de ses effets antiradicalaires.

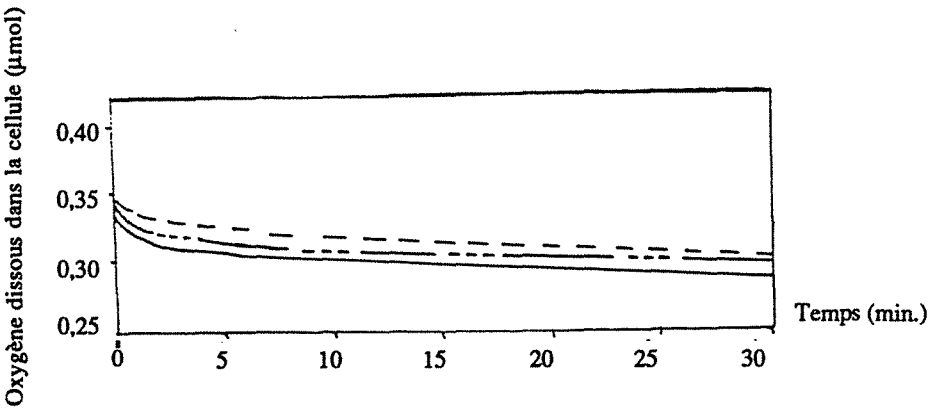


Figure 46 : Effet de l'acide urique sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

_____ Moutarde : 2 ml

_ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Acide urique : 25 µmol (soit 69 µmol/g moutarde)

_ _ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Acide urique : 100 µmol (soit 278 µmol/g moutarde)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde	33,4	3,22
Moutarde + Ac. urique 25 µmol	31,7	1,92
Moutarde + Ac. urique 100 µmol	22,4	2,42

Tableau 15 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en acide urique (Figure 46).

Ajoutons par ailleurs que la faible solubilité de l'acide urique et ses conséquences, notamment au niveau articulaire (goutte), en limitent sérieusement l'utilisation comme antioxydant.

5 . MANNITOL

Le mannitol est un polyol présent naturellement dans les algues marines et certains végétaux : citrouille, céleri, fraise entre autres. Il est également utilisé comme adjuvant dans les médicaments.

Le mannitol possède une activité antioxydante liée à sa capacité de piéger les radicaux $OH^{\bullet}$.

L'addition de mannitol dans la cellule de l'Oxygraphe à raison de 35 à 140 µmol/g de moutarde montre un léger effet protecteur seulement pour les concentrations les plus élevées (Figure 47).

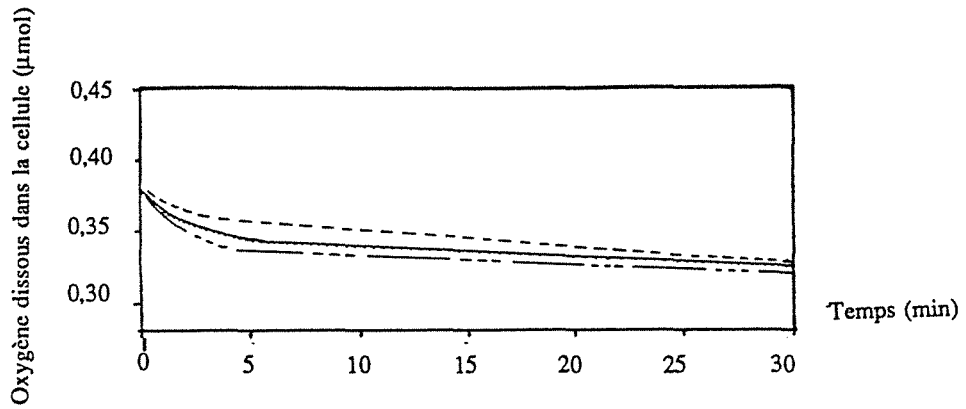


Figure 47 : Influence du mannitol sur la vitesse d'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

_____ Moutarde : 2 ml

_ _ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Mannitol : 12,5 µmol (34,7 µmol/g)

..... Moutarde : 2 ml
Mannitol : 25 µmol (69,4 µmol/g)

_ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Mannitol : 50 µmol (138,9 µmol/g)

	Vitesse initiale (nmmol/min/g)	Vitesse finale (nmol/min/g)
Moutarde	31,9	1,94
Moutarde + Mannitol 12,5 µmol	41,6	1,99
Moutarde + Mannitol 25 µmol	32,4	1,94
Moutarde + Mannitol 50 µmol	21,1	3,15

Tableau 16 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en mannitol (Figure 47)

Ceci confirme, une fois encore, la formation de radicaux OH° au cours de l'auto-oxydation de la moutarde ; toutefois, la quantité formée semble faible. A condition que l'additif ne soit pas toxique à cette dose et ne modifie pas trop les propriétés organoleptiques de la moutarde, l'utilisation du mannitol peut être envisagée, après analyse des paramètres économiques.

6. ACIDES AMINES ET DERIVES

6.1. Cystéine

La cystéine est capable d'inhiber le brunissement enzymatique en formant avec les quinones issues des réactions d'oxydation des composés stables.

Selon WALKER et REDDISH (1964), la couleur du complexe formé dépend du rapport cystéine/phénol. En présence d'une quantité suffisante d'acide aminé, le complexe sera incolore. MONTGOMERY (1983) a montré que la cystéine agissait sur le brunissement du jus de poire en début de réaction et qu'elle empêchait également la formation de produits bruns au cours de l'entreposage.

La cystéine contribue également à limiter le brunissement non enzymatique par un phénomène de compétition avec les acides aminés endogènes.

Un autre mode d'action consiste à inhiber la formation des radicaux libres primaires. L'acide aminé est, en effet, capable de chélater les ions Cu^{2+}. SVENSSON (1988) a, d'autre part, montré que la cystéine pouvait inhiber les réactions d'oxydation induites par les radicaux $O_2^{\circ -}$.

L'efficacité de la cystéine en tant qu'antioxydant a été largement expérimentée pour la protection de différents produits alimentaires : lait, jus de fruits ou fruits frais (ARNOLD, 1969 ; LANGDON, 1987 ; KROH et coll., 1989 ; SAPERS et HICKS, 1989).

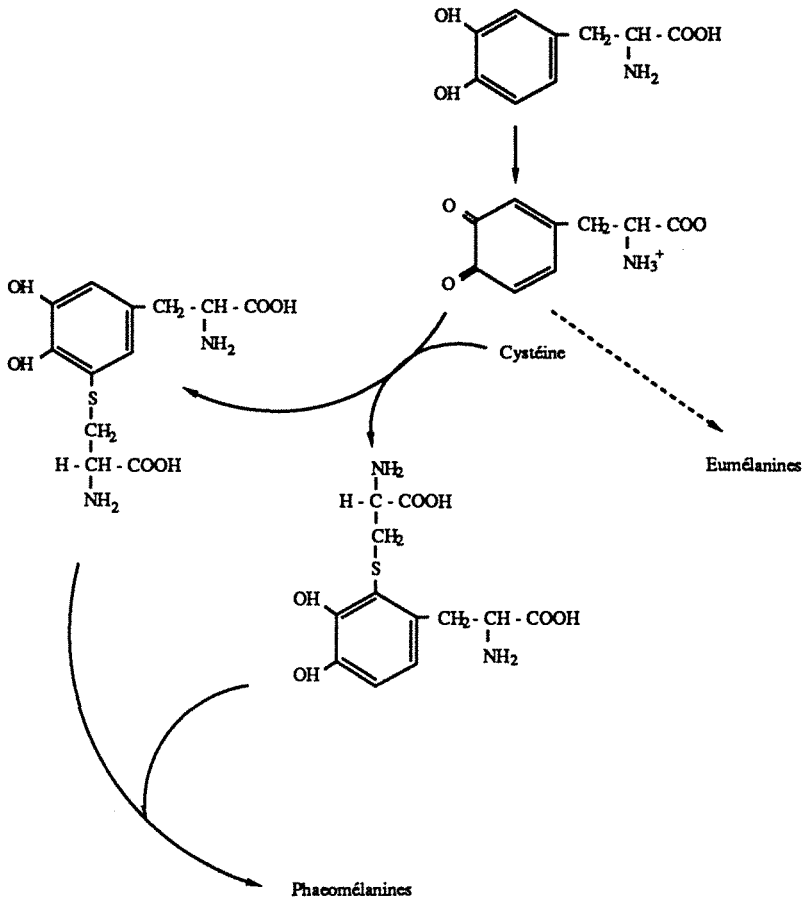


Figure 48 : Mécanisme d'action de la cystéine dans l'inhibition du brunissement non enzymatique. Application à la condensation de la cystéine en présence de tyrosine.

Nous avons voulu observer l'effet de la cystéine sur la moutarde à 20 % (p/v). La mesure est effectuée à l'Oxygraphe. La cystéine ralentit nettement la consommation d'oxygène dissous (Figure 49).

L'effet optimal est obtenu pour une concentration en cystéine de 1,7 mg/g de moutarde.

Les résultats montrent par ailleurs que l'autooxydation de la moutarde en présence de cystéine varie avec l'âge de la moutarde. Une faible concentration en additif est nécessaire pour assurer la protection d'une moutarde fraîche : de 0,8 à 1,7 mg/g de moutarde. La concentration efficace doit être accrue au fur et à mesure que la moutarde vieillit : elle est de 4,2 mg/g pour un temps de conservation compris entre 2 et 3 mois et de 8,4 mg/g au delà, avec un effet protecteur beaucoup moins marqué (Figure 50).

Ceci semble confirmer les observations de MONTGOMERY (1983), selon lesquelles la cystéine pourrait agir selon un processus séquentiel en deux étapes : en début de réaction, d'une part, puis au cours de l'entreposage.

Par ailleurs, DUDLEY et HOTCHKISS (1989) ont observé, en présence de cystéine, une période d'induction dans la formation des produits bruns, lors de phénomènes d'autooxydation. Pendant cette période, la 2,3 dihydroxyphénylcystéine (SDPC), produit d'addition de la réaction entre cystéine et phénol a pu être mise en évidence par SANADA et coll. (1972).

Quand la cystéine libre a totalement réagi, les phénols sont en mesure de se polycondenser pour donner lieu à la formation de produits bruns. Toutefois, si la concentration en SDPC est suffisante, DUDLEY et HOTCHKISS (1989) et SANADA et coll. (1972) ont noté l'effet inhibiteur de ce produit d'addition sur la vitesse de formation des pigments bruns. Ce phénomène peut correspondre à la seconde phase de l'inhibition observée avec des moutardes en cours de conservation.

SANADA et coll. (1972) attribuent cet effet inhibiteur de la SDPC à une action directe de ce composé sur la PPO, alors que, selon DUDLEY et HOTCHKISS (1989), l'action est liée à une réaction complémentaire du SDPC sur l'ortho-phénylquinone. Les expériences

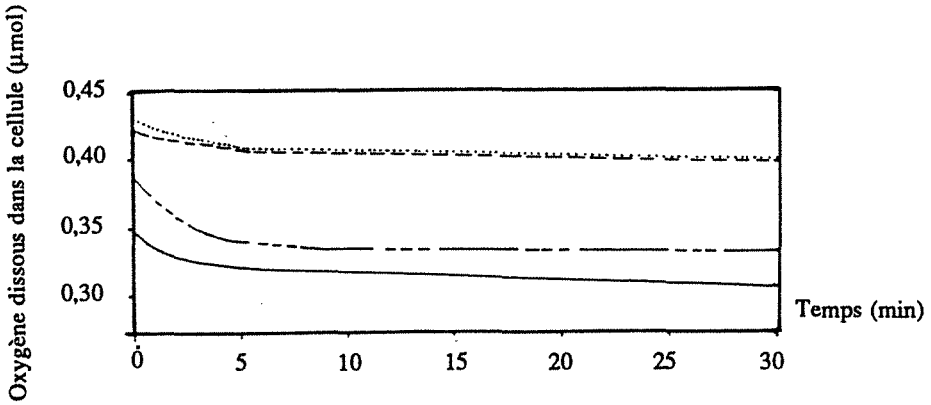


Figure 49 : Influence de la cystéine sur la vitesse d'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée fraîche.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

_____ Moutarde : 2 ml

..... Moutarde : 2 ml
Cystéine : 5,0 µmol (1,7 mg/g)

_ _ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Cystéine : 2,5 µmol (0,84 mg/g)

_ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Cystéine : 25 µmol (8,4 mg/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	21,6	1,6
Moutarde + Cystéine 2,5 µmol	9,5	1,3
Moutarde + Cystéine 5 µmol	14,1	1,3
Moutarde + Cystéine 25 µmol	37,4	7,0

Tableau 17: Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en cystéine (Figure 49).

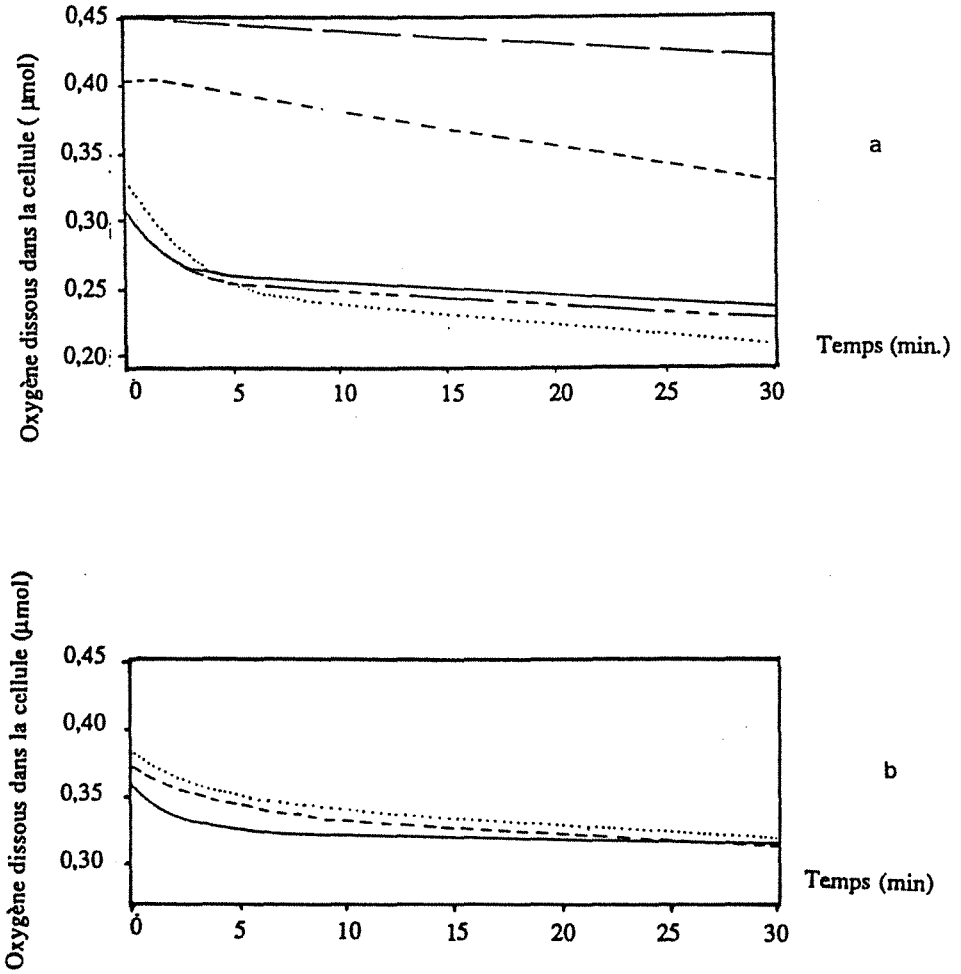


Figure 50 : Influence de l'âge d'une moutarde sur son autooxydation, en présence de cystéine.
a. Moutarde agée de 2 mois
b. Moutarde agée de 20 mois
Moutarde après 8 jours : voir Figure 49

Suspension de moutarde non sulfitée à 20% (p/v) en tampon **acétate de pH** 3,8.

_____ Moutarde non sulfitée : 2 ml

_ _ _ _ Moutarde non sulfitée : 2 ml
Cystéine : 5 µmol (soit 13,9 µmol/g ou 1,7 mg/g)

_ _ _ _ _ Moutarde non sulfitée : 2 ml
Cystéine : 12,5 µmol (soit 34,7 µmol/g ou 4,2 mg/g)

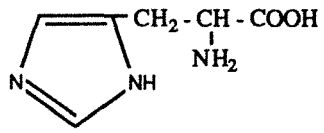
..... Moutarde non sulfitée : 2 ml
Cystéine : 25 µmol (soit 69 µmol/g ou 8,4 mg/g)

effectuées sur la moutarde enrichie en cystéine nous incitent à nous orienter vers la seconde hypothèse en raison de la faiblesse de l'activité PPO dans la pâte de moutarde (cf. Chapitre 3).

Bien que cet acide aminé soit globalement intéressant en tant qu'antioxydant, il convient néanmoins de préciser le comportement des principaux constituants de la moutarde vis-à-vis de l'auto-oxydation en présence de ce composé. Cette observation est particulièrement valable pour les lipides non saturés, car il est bien connu que l'oxydation du système cystéine/Fe^{2+} par l'intermédiaire des hydroperoxydes lipidiques donne lieu à la manifestation d'un cycle redox.

De plus, selon WALKER et REDDISH (1964), utilisée dans des proportions raisonnables, la cystéine n'affecte pas les qualités organoleptiques du produit.

6. 2 . Histidine



L'histidine renferme un noyau imidazole doué d'une grande réactivité, à cause de sa structure électronique. Cet acide aminé est un inhibiteur de l'activité ortho-diphénol oxydasique (E.C.1.10.3.1) dans la mesure où il forme des chélates avec les ions Cu^{2+}. Toutefois, son efficacité protectrice à l'égard de la moutarde est beaucoup moins marquée qu'avec la cystéine (Figure 51).

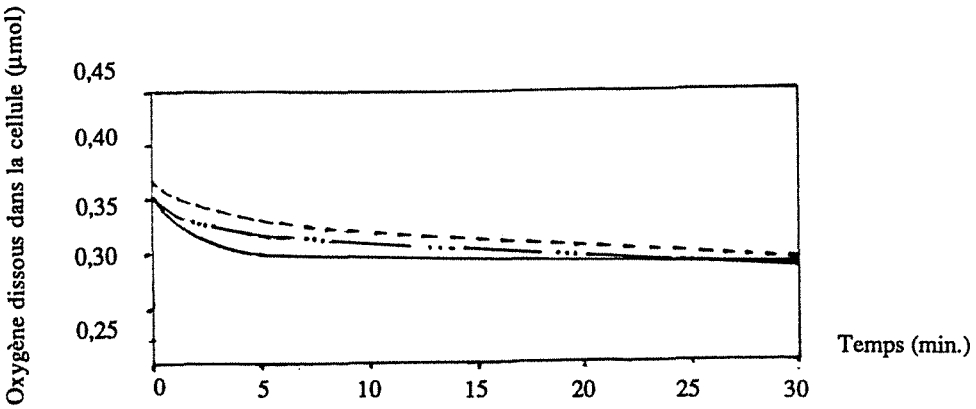


Figure 51 : Effet de l'histidine sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

_____ Moutarde : 2 ml

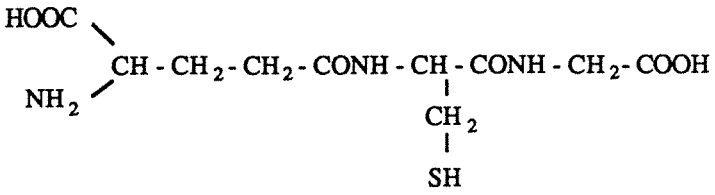
_ _ _ _ _ Moutarde : 2 ml
Histidine : 10 µmol (4,3 mg/g)

_____ . . . Moutarde : 2 ml
Histidine : 20 µmol (8,6 mg/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitese finale (nmol/min./g)
Moutarde	50,92	1,28
Moutarde + Histidine. 10 µmol	34,25	3,50
Moutarde + Histidine. 20 µmol	32,42	2,92

Tableau 18 : Vitesses de consommation de l'oxygène d'une moutarde enrichie en histidine (Figure 51).

6. 3. Glutathion



γ Glutamyl - Cystéyl - Glycine

Comme nous l'avons vu précédemment, le glutathion est facilement oxydé, notamment en présence de cations métalliques, tout comme l'acide ascorbique.

$$2\ GSH \longrightarrow GS.SG + 2\ H^+ + 2e^-$$

Ce tripeptide est présent dans les cellules animales et végétales, notamment dans les chloroplastes des plantes vertes, où il participe à l'élimination des entités oxydantes telles que $O_2^{-\cdot}$ et H_2O_2, formées au cours de la photosynthèse (WISE et NAYLOR, 1987).

Le glutathion limite les effets de l'oxydation provoquée par le peroxyde d'hydrogène (ANDREOLI & coll., 1986)., il est également capable de réagir lentement avec les radicaux $O_2^{-\cdot}$ (Mc NEIL & coll., 1981). Il réduit aussi les hydro peroxydes lipidiques, en présence de glutathion peroxydase :

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GS.SG + H_2O$$

Selon WILLIAMSON (1989), le glutathion possède également un effet antioxydant lié à sa capacité de chélater les ions Cu^{2+} et de piéger l'oxygène moléculaire. Toutefois, cette réaction séquentielle conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène. L'effet antioxydant du peptide ne se manifeste qu'au cours de la première étape :

$$6GSH + O_2 + 2Cu^{2+} \longrightarrow GSSG + 2GS\text{-}Cu\text{-}GS + H_2O_2 + 4H^+$$

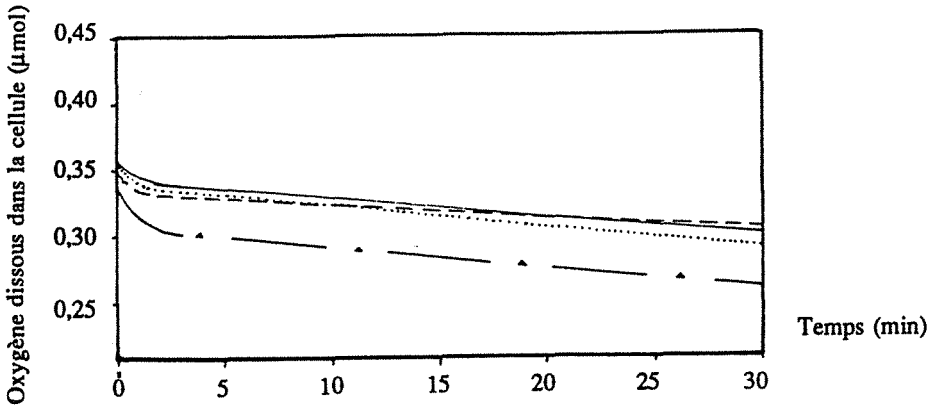


Figure 52 : Influence du glutathion sur l'autooxydation de la moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8

——— Moutarde non sulfitée : 2 ml

——▲ Moutarde non sulfitée : 2 ml
Glutathion : 12,5 µmol (soit 34,7 µmol/g)

_ _ _ _ _ Moutarde non sulfitée : 2 ml
Glutathion : 25 µmol (soit 69 µmol/g)

. . . . . Moutarde non sulfitée : 2 ml
Glutathion : 50 µmol (soit 139 µmol/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	26,1	3,9
Moutarde + Glutathion 12,5 µmol	46,4	4,8
Moutarde + Glutathion 25 µmol	30	3,1
Moutarde + Glutathion 50 µmol	31,3	4,7

Tableau 19: Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en glutathion (Figure 52).

Un effet prooxydant a été attribué par LIEBLER et coll. (1986) au glutathion quand ce dernier est mis en présence du système Fe^{2+}/H_2O_2 et utilisé en synergie avec l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol.

Ajoutons que le résultat inverse a été observé par ROUSSEAU et coll. (1988) pourtant dans les mêmes conditions de synergie. La réactivité du glutathion peut être attribuée dans ce cas à la fonction amine de l'additif et non plus à la mobilité de l'hydrogène du groupement thiol.

Contrairement à la cystéine, nous avons pu observer que l'addition de glutathion à la moutarde à raison de 35 à 140 µmol/g de moutarde n'entraîne pas d'effet protecteur (Figure 52).

Ces résultats peuvent être attribués au fait que le peroxyde d'hydrogène n'est pas produit, ou produit seulement en faible quantité, au cours de l'auto-oxydation de la moutarde. Cette observation est en accord avec les observations faites précédemment ; les radicaux libres tels que $O_2^{-\cdot}$ sont peut-être formés, mais leur réactivité vis-à-vis du glutathion est lente.

Puisque, dans la moutarde, les cations Fe^{2+} et Fe^{3+} sont présents, ils pourront réagir avec le glutathion qui contribue ainsi à la régénération de Fe^{2+}. Le glutathion, ajouté à la moutarde a un effet pro-oxydant plus marqué quand il est apporté aux concentrations les plus faibles.

En conclusion, la cystéine est beaucoup plus efficace que le glutathion pour la protection de la moutarde.

6.4 . Produits des réactions de Maillard

Les produits issus des réactions d'Amadori et de Maillard sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (KAWASHIMA & coll., 1981 ; EICHNER, 1981 ; LINGNERT et ERIKSSON, 1981 ; YAMAGUCHI & coll., 1981 ; TANAKA & coll., 1988 ; FARAG & coll., 1989).

Nous avons comparé l'efficacité des produits issus de la condensation du xylose ou du glucose avec la cystéine (cf. Matériel et Méthodes).

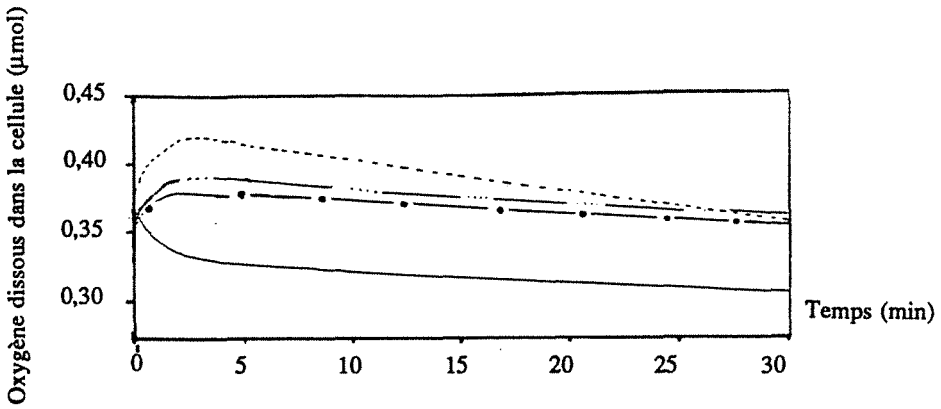


Figure 53 : Auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée, en présence de cystéine seule ou d'un mélange cystéine-glucose (ou cystéine-xylose).

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

Cystéine 0,5% + Sucre 2% dans tampon phosphate pH 5, chauffé 1/2 h à 100°C.

——— Moutarde : 2 ml

- - - - - Moutarde : 2 ml
Cystéine : 12 µmol (33 µmol/g)

——— • Moutarde : 2 ml
Cystéine/xylose : 1 µmol équiv. cystéine (2,8 µmol/g)

——···· Moutarde : 2 ml
Cystéine/glucose : 1 µmol équiv. cystéine (2,8 µmol/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitese finale (nmol/min./g)
Moutarde	56,5	1,8
Moutarde + Cystéine	- 71,5	5,8
Moutarde + Cystéine/Xylose	- 39,9	2,2
Moutarde + Cystéine/Glucose	- 58,0	2,7

Tableau 20 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en dérivés d'Amadori incluant de la cystéine (Figure 53)

Les essais nous ont montré que la vitesse d'auto-oxydation de la moutarde est ralentie après addition de ces composés. L'inhibition est toutefois moins marquée qu'en présence de cystéine seule. Cependant, il est important d'observer que les quantités de cystéine nécessaires pour un effet optimal (2,8 µmol/g de moutarde) sont bien inférieures à celles mises en jeu dans le cas d'une réaction inhibée par la cystéine seule (33 µmol/g de moutarde).

Les tentatives d'utilisation des produits de condensation glucide - acide aminé ou glucide peptide (KAWASHIMA et coll., 1981) en tant qu'antioxydants ont été effectués dans un but de protection des lipides non saturés contre l'autooxydation. Le mécanisme d'action n'est pas clairement démontré.

Selon TANAKA et coll. (1988) et YAMAGUCHI et coll. (1981), l'effet antioxydant serait plus important avec des produits de condensation de poids moléculaires plus élevés. Récemment, HAYASE et coll. (1989) ont confirmé le rôle des mélanoïdines dans le piégeage des formes actives de l'oxygène (radicaux libres, H_2O_2). En revanche, LINGNERT et ERIKSSON (1981) et EICHNER (1981) attribuent plutôt la protection des lipides à l'action des réductones, de poids moléculaire faible. Pour ces auteurs, l'action des produits issus des réactions de Maillard se traduit par une inactivation des radicaux libres lipidiques avec formation d'hydroperoxydes en même temps qu'une réduction des peroxydes, ce qui contribue globalement à diminuer la formation des produits de rancissement. Ainsi, EICHNER (1981) a identifié, par spectrométrie de masse, l'acide hydroxylinoléique produit de la réduction par les composés de Maillard de l'hydroperoxyde de l'acide linoléique, hydroperoxyde résultant de l'autooxydation.

Selon GOMYO et HORIKOSHI (1976), les produits des réactions de Maillard agissent comme complexants des cations métalliques. Toutefois, selon LINGNERT et ERIKSSON (1981), cette réaction n'intervient que faiblement dans le processus d'inhibition développé par ces composés ; selon EICHNER (1981), l'activité antioxydante ne serait pas liée à une complexation des cations.

FARAG et coll. (1989) ont noté par ailleurs une activité antihydrolytique des composés de Maillard à l'égard des lipides. Ils ont démontré que cette action était liée à l'inhibition de la croissance de microorganismes libérant des enzymes hydrolytiques. On peut toutefois éliminer cette hypothèse pour la moutarde en raison du nombre réduit de microorganismes présents.

L'efficacité des produits de Maillard dépend de la nature de la combinaison aminoacide - glucide élaborée. Le pHi de l'acide aminé semble jouer un rôle important corrélé avec l'effet antioxydant.

7. EXTRAITS VEGETAUX

Les expériences effectuées avec les composés phénoliques simples nous ont permis de constater leur efficacité dans l'inhibition de l'autooxydation de la moutarde.

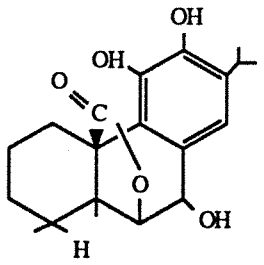
Par ailleurs, l'origine naturelle de ces composés a favorisé l'utilisation des flavonoïdes d'arachide (ABDEL RIHMAN, 1985), de pomme (SAL'KOVA et AMZASHVILI, 1988) ou encore l'utilisation des extraits de basilic, d'origan, de romarin, de sauge, d'ail, pour leurs propriétés antioxydantes (PIZZACORO et coll., 1985 ; NAKATANI et KIKUZAKI, 1987, KIKUZAKI et NAKATANI, 1989...).

Dans ce contexte, nous avons été amenés à étudier l'effet sur la moutarde d'une essence de romarin désodorisée.

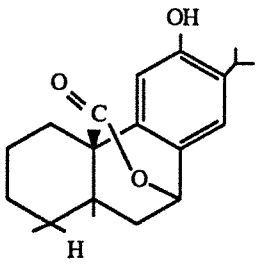
7. 1. Extraits de romarin

7.1.1. Extrait de romarin seul.

L'effet antioxydant des extraits de romarin est attribué à certains composés phénoliques porteurs de groupements orthodiphénols. Les principaux sont le carnosol et le rosmanol (INATANI et coll., 1983 ; BERSET et coll., 1989 ; NAMIKI, 1990 ; CUVELIER et coll., 1990).



Rosmanol



Carnosol

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de romarin CAL PFIZER contribue à ralentir la consommation d'oxygène, à l'Oxygraphe. La concentration maximale efficace est de un gramme d'extrait par kilogramme de pâte de moutarde (Figure 54).

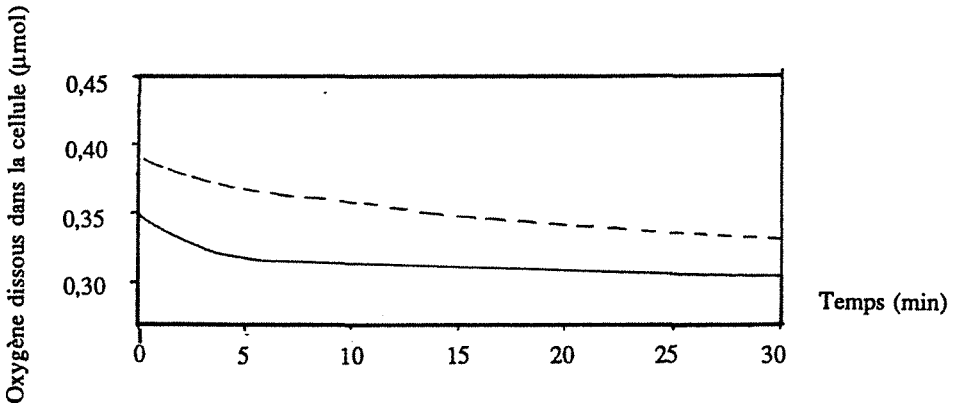


Figure 54 : Effet de l'extrait de romarin sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

_____ Moutarde : 2 ml

_ _ _ Moutarde : 2 ml
Extrait de romarin : 2,5 mg (soit 7 mg/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitese finale (nmol/min./g)
Moutarde	19,3	1,5
Moutarde + Romarin	14,2	3,9

Tableau 21 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en extrait de romarin (Figure 54).

Comme pour l'α-tocophérol et la D-(+)-Catéchine, il est possible aussi d'envisager l'utilisation de l'extrait de romarin en synergie avec un autre antioxydant. Ceci pourrait conduire à une efficacité inhibitrice plus élevée tout en réduisant la concentration en additif le plus coûteux. Ajoutons qu'une analyse sensorielle serait également nécessaire pour apprécier si l'extrait de romarin, même désodorisé, ne modifie pas trop les propriétés organoleptiques de la moutarde à laquelle il est ajouté.

7.1.2. Extrait de romarin en synergie avec la cystéine.

L'association romarin/cystéine témoigne d'un effet inhibiteur intéressant, toutefois, cet effet semble surtout lié à la présence de l'acide aminé. L'effet antioxydant est cependant moins marqué, pour une même quantité de cystéine, dans la moutarde contenant la combinaison romarin/cystéine que dans la moutarde enrichie en cystéine seule (Figure 55).

7.2. Extrait de thé vert.

L'extrait obtenu par infusion des feuilles de thé vert séchées et étuvées est utilisé à la concentration finale de 0,5 % (p/v) dans l'eau.

Le thé vert contient une forte proportion de composés polyphénoliques : flavanols et flavanes-3-ol, flavanes-3-ol acylés ou glycosylés et tanins hydrolysables ou condensés.

Au cours de la fermentation du thé vert en thé noir, ce sont essentiellement les flavonols glucosides et les flavanes-3-ol acylés qui sont transformés.

Les composés du thé vert agissent soit en tant que séquestrants de certains cations de métaux lourds, principalement les catéchines. Cette observation est en accord avec les résultats de TANIZAWA & coll. (1984). Ces auteurs ont mis en évidence la manifestation d'un effet antioxydant des composés du thé vert vis-à-vis de l'acide linoléique. L'effet inhibiteur maximal serait imputable en grande partie à la L-(+)-Catéchine. Ces résultats ont été récemment confirmés par KROYER & coll (1989).

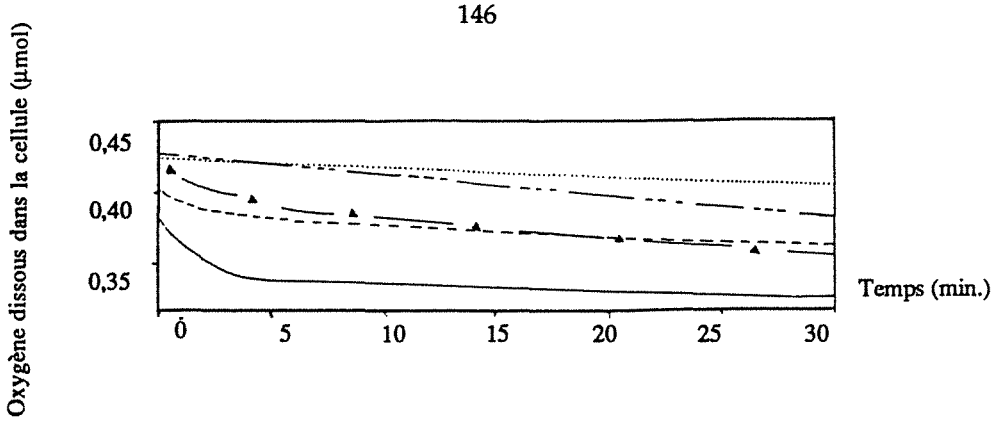


Figure 55 : Influence de l'association (cystéine-romarin désodorisé) sur l'auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée fraîche.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde : 2 ml

- - - — Moutarde : 2 ml
Cystéine : 5 µmol (14 µmol/g)
Romarin : 2,5 µg (7 µg/g)

····· Moutarde : 2 ml
Cystéine : 5,0 µmol (14 µmol/g)

——▲ Moutarde : 2 ml
Cystéine : 10 µmol (28 µmol/g)
Romarin : 2,5 µg (7 µg/g)

- - - - - Moutarde : 2 ml
Romarin : 2,5 µg (7 µg/g)

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde	50,7	1,64
Moutarde + Cyst. 5 µmol + Romarin. 2,5 µg	4,2	4,25
Moutarde + Cyst. 10 µmol + Romarin 2,5 µg	24,4	2,08
Moutarde + Cystéine. 5 µmol	1,9	1,86
Moutarde + Romarin. 2,5 µg	35,0	3,78

Tableau 22 : Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en cystéine et en extrait de romarin (Figure 55).

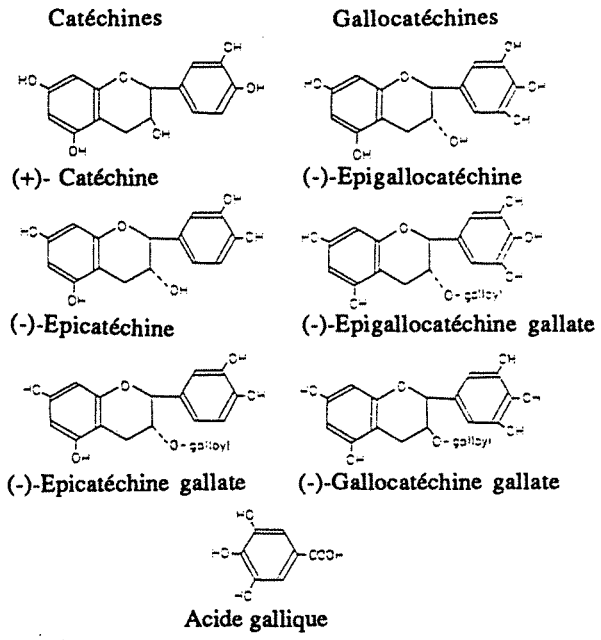


Figure 56 : Principales catéchines (flavane-3-ol) présentes dans les feuilles de thé vert.

L'effet antioxydant est en même temps la résultante du piégeage des radicaux libres, ce qui aboutit à la formation de dérivés stables non autooxydables.

Les tanins ont également la capacité de former avec les protéines des associations solubles et insolubles. Des liaisons hydrogènes, hydrophobes, ioniques ou covalentes peuvent s'établir entre certains groupements protéiques (- NH_2, = CO, groupements : ε-aminé de la lysine, OH de la tyrosine, SH de la cystéine), les phénols ou encore les quinones (HAGERMAN et BUTLER, 1981 ; ASANO & coll., 1982 ; ASQUITH et BUTLER, 1986 ; OH & coll., 1980 ; BEART & coll., 1985 ; Mc MANUS & coll., 1985) (Figure 57).

Le thé agirait comme inhibiteur des réactions radicalaires induites par le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) d'une part, et d'autre part comme inhibiteur du brunissement non enzymatique en bloquant les groupements α-aminés de certains résidus aminoacides ou ε-aminés de résidus lysine. On peut également envisager l'inhibition du brunissement enzymatique dans le cas où l'association entre tanin et oxydase tend à bloquer le site actif de l'enzyme.

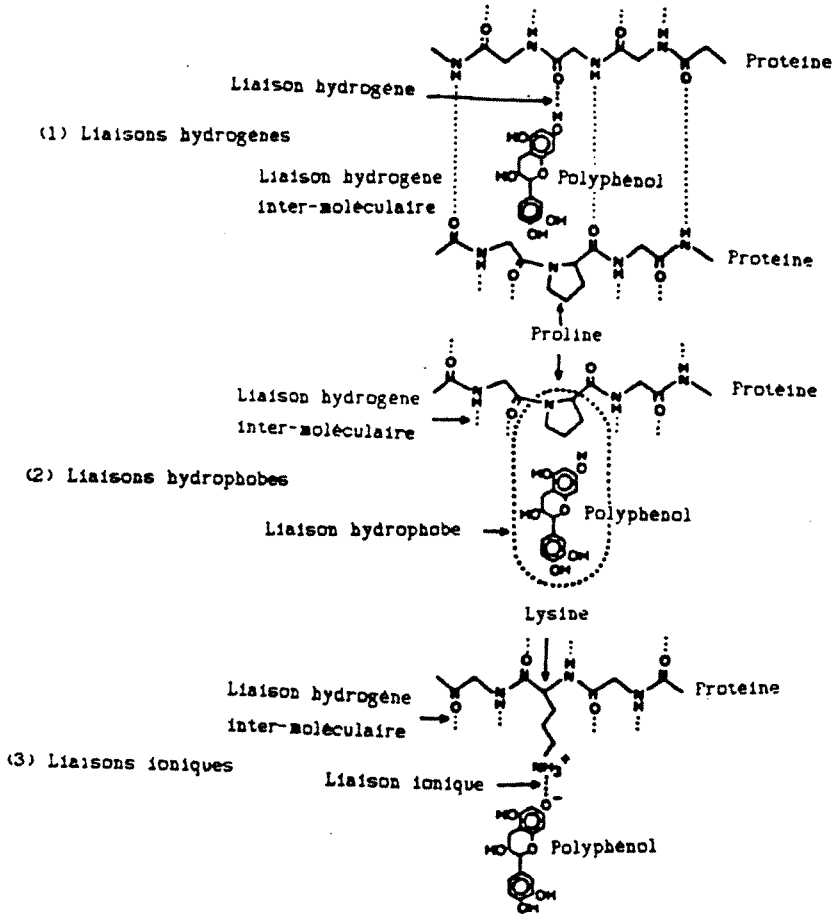


Figure 57 : Modes d'association des protéines avec les polyphénols.
(d'après ASANO et coll., 1982)

Nous avons introduit successivement, dans la cellule de l'Oxygraphe, 2 ml de suspension de moutarde à 20% (p/v) et des quantités suffisantes d'extrait de thé pour atteindre les concentrations respectives de 0 à 0,375 µg d'extrait sec par ml (soit de 0 à 2,1 µg d'extrait sec/g de moutarde).

L'extrait obtenu présente de bonnes propriétés antioxydantes, la consommation d'oxygène est nettement diminuée. Dans ces conditions, nous avons obtenu de bons résultats avec une concentration de 1,74 µg d'extrait sec de thé vert par gramme de moutarde (Figure 58).

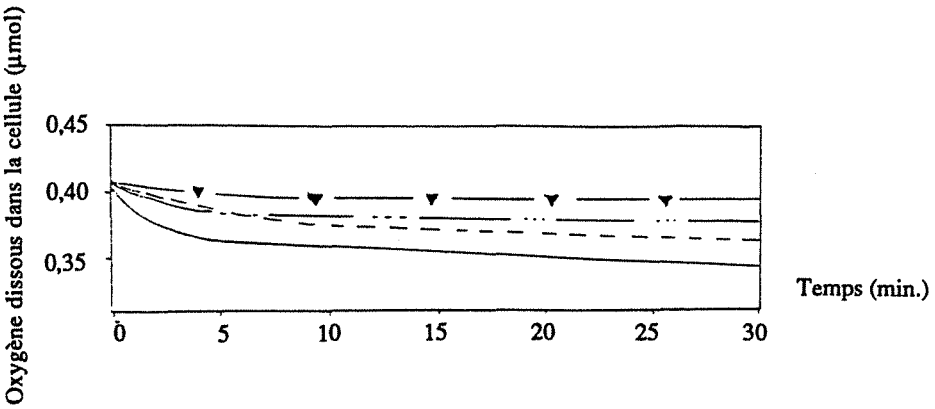


Figure 57 : Auto-oxydation d'une moutarde non sulfitée, en présence ou non d'un extrait de thé vert.

Moutarde à 20% (p/v) dans tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

Thé vert à 0,5 % (p/v) dans l'eau

_____	Moutarde	: 2	ml	
_ _ _ _ _	Moutarde	: 2	ml	
	Thé vert	: 25	µl	soit 0,35 µg de thé/g moutarde
____...	Moutarde	: 2	ml	
	Thé vert	:100	µl	soit 1,39 µg de thé/g moutarde
____▼	Moutarde	: 2	ml	
	Thé vert	:150	µl	soit 2,08 µg de thé/g moutarde

	Vitesse initiale (nmol/min./g)	Vitesse finale (nmol/min./g)
Moutarde seule	40	2,4
Moutarde + Extrait thé 0,35 µg	13,3	2,6
Moutarde + Extrait thé 1,39 µg	18,1	0,6
Moutarde + Extrait thé 2,08 µg	4,4	0,3

Tableau 23: Vitesses de consommation de l'oxygène par la moutarde enrichie en extrait de thé vert (Figure 57).

8. CONCLUSION.

Il ressort de cette étude que certains antioxydants ajoutés à la moutarde ont un effet contraire à celui recherché, principalement à cause des réactions radicalaires qui s'y développent et en raison aussi des cations de métaux lourds, notamment du fer. Il s'agit principalement de l'α-tocophérol, de l'acide ascorbique et de l'EDTA.

Les composés phénoliques sont, dans l'ensemble, de bons antioxydants en l'absence de cations de métaux lourds. Toutefois, leur efficacité varie avec leur concentration et avec le temps de conservation de la moutarde. Ce sont les composés polyphénoliques du thé vert qui nous semblent les plus efficaces.

Les produits issus des réactions d'Amadori et de Maillard manifestent également une efficacité satisfaisante à des teneurs relativement faibles.

L'étude du devenir de ces antioxydants et des propriétés des constituants de la moutarde au cours de sa conservation nous est apparue nécessaire pour mieux comprendre le mécanisme de leur action.

CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA TRANSFORMATION DES CONSTITUANTS DE LA MOUTARDE AU COURS DE L'AUTO-OXYDATION.

Nous avons développé une recherche pour étudier les réactions qui conduisent à l'oxydation des constituants de la moutarde. Dans ce contexte, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux processus responsables du brunissement.

I. ACTIVITE PEROXYDASIQUE

La détermination du pouvoir réducteur ayant confirmé la présence de composés potentiellement autooxydables, susceptibles de conduire à la formation de peroxyde d'hydrogène, il nous a semblé intéressant de définir le rôle de la peroxydase de la moutarde dans ce contexte.

1. Analyse du mécanisme d'oxydation du NADH par la peroxydase

Pour cela nous avons eu recours à l'utilisation d'un nucléotide réduit (NADH, H^+) dont nous avons suivi l'oxydation en présence de la peroxydase endogène contenue dans la pâte de moutarde afin de mettre en évidence les propriétés oxydasiques de l'enzyme.

1.1. Généralités

Le NADH peut servir de donneur d'hydrogène dans la réaction peroxydasique.

$$ROOH + NADH + H^+ \xrightarrow{(POD)} H_2O + ROH + NAD^+$$

Selon YOKOTA et YAMAZAKI (1977), HALLIWELL (1978) et MÄDER et AMBERG-FISHER (1982), la réaction nécessite la présence de peroxyde d'hydrogène, en quantités catalytiques. Ces observations ont été rapportées au cours de l'étude des peroxydases de raifort (YOKOTA (1977) et HALLIWELL (1978)) et de tabac (MÄDER, 1982).

Si le peroxyde d'hydrogène n'est pas présent dans le milieu, on observera un temps d'induction dans la réaction d'oxydation du NADH, temps correspondant à l'auto oxydation du cofacteur :

$$NADH + H^+ + O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O_2$$

La réaction nécessite la présence d'un effecteur : Mn^{2+}.

Au cours de la réaction peroxydasique, plusieurs intermédiaires sont formés :

$$POX + H_2O_2 \longrightarrow \text{Composé 1}$$
$$\text{Composé 1} + NADH \longrightarrow \text{Composé 2} + NAD^\circ$$
$$\text{Composé 2} + NADH \longrightarrow POX + NAD^\circ + 2H_2O$$

Les radicaux NAD° formés sont éliminés par action de l'oxygène moléculaire :

$$NAD^\circ + O_2 \longrightarrow NAD^+ + O_2^{\circ -}$$

Cette réaction constitue la principale source de consommation d'oxygène par une solution aqueuse de NADH.

Les radicaux superoxydes formés pourront ensuite se dismuter, la réaction étant accélérée en présence de superoxyde dismutase :

$$O_2^{\circ -} + O_2^{\circ -} \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

On peut aussi considérer qu'en l'absence de cette enzyme, O2-° peut réagir avec une autre molécule de NADH pour former H_2O_2 :

$$O_2^{\circ -} + NADH \longrightarrow NAD^\circ + H_2O_2$$

Dans la moutarde, la réaction peut être initiée par l'autooxydation des constituants de la moutarde, libérant ainsi du peroxyde d'hydrogène en quantité faible mais suffisante pour permettre la réaction.

Les anions superoxydes formés sont disponibles, a priori, pour réagir avec les composés de la moutarde.

Selon HALLIWELL (1978) et MÄDER et AMBERG-FISHER (1982), les anions superoxydes peuvent également provenir de la décomposition du composé 3, forme active de la peroxydase, selon l'équation :

$$\text{Composé 3} \longrightarrow \text{POD} + O_2^{\circ -}$$

Cette réaction pourrait être accélérée par la présence de phénols, dont les teneurs dans la moutarde sont loin d'être négligeables.

1.2. Etude, à l'Oxygraphe, de l'oxydation du NADH par la POD de moutarde.

L'oxydation du NADH, ajouté à raison de 0,63 mmol/l à une suspension de moutarde non sulfitée à 20 % (p/v) dans du tampon acétate, est suivie à l'Oxygraphe.

Le processus oxydatif semble dépendre du temps de conservation de la moutarde.

Pour une moutarde de fabrication récente, le NADH ajouté est rapidement oxydé avec consommation importante d'oxygène (Figure 59). Le processus est beaucoup ralenti lorsque la moutarde est plus ancienne (10 mois après la fabrication).

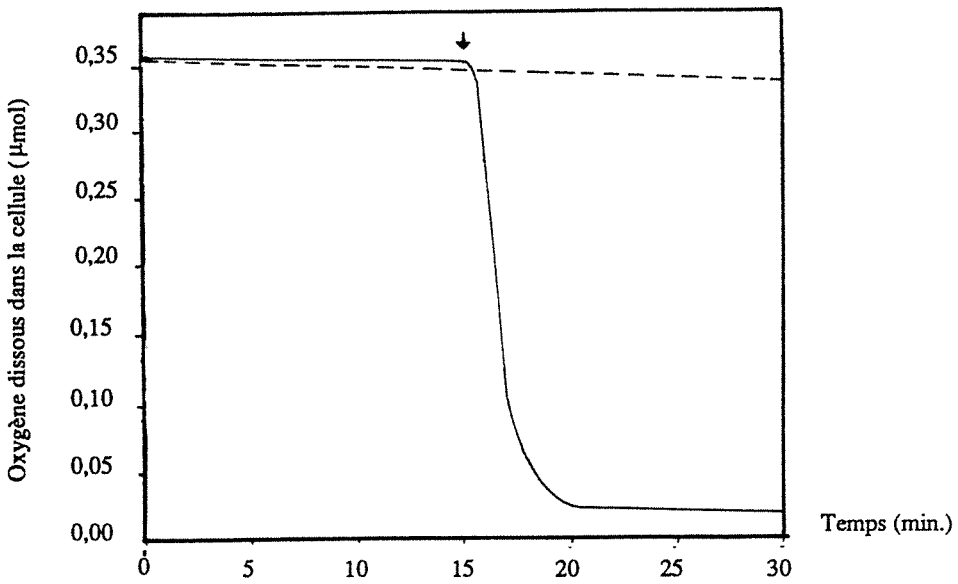


Figure 59 : Oxydation du NADH dans une moutarde non sulfitée.
Influence de l'âge de la moutarde.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde fraîche : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 µl

– – – – – Moutarde de 11 mois : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 25 µl

↓ Addition de NADH : 1,25 µmol (soit 3,5 µmol/g)

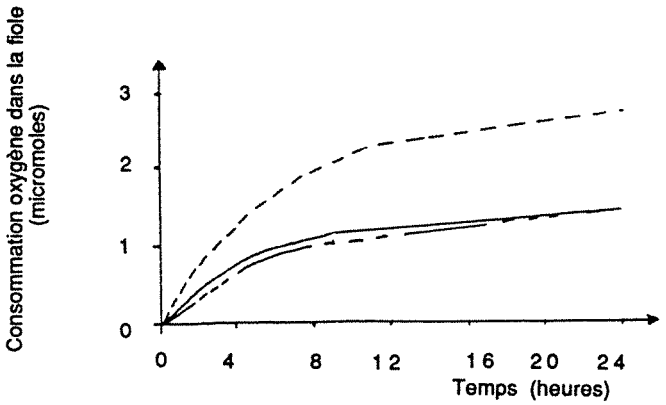


Figure 60 : Effet du NADH sur l'absorption d'oxygène d'une moutarde non sulfitée, suivie au respiromètre.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

——— Moutarde fraîche : 5 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 62,5 µl

– – – – Moutarde fraîche : 5 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 62,5 µl
NADH : 5 µmol

– – – ——— NADH seul : 5 µmol (5,6 µmol/g)
Tampon pH 3,8 : 5 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 62,5 µl

En l'absence de POD, l'oxydation directe du NADH par l'oxygène moléculaire est une réaction lente. La consommation rapide d'oxygène lors de l'addition du NADH à une moutarde fraîche peut être corrélée avec la présence dans la moutarde d'une peroxydase dont l'activité oxydasique est importante.

1.3. Etude respirométrique de l'oxydation du NADH ajouté à la moutarde.

L'expérience sur moutarde fraîche a été renouvelée en suivant la consommation d'oxygène au respiromètre.

Les résultats montrent que, quand le NADH est ajouté à la moutarde à raison d'une mmol/l (soit 5,6 µmol/g de moutarde), la consommation d'oxygène est augmentée. La quantité d'oxygène absorbé correspond approximativement à la somme des quantités absorbées respectivement par la suspension de moutarde seule et par le NADH rajouté (Figure 60).

Dans la fiole, sur les 5 µmoles de NADH rajoutés 1/5 seulement a donné lieu à la consommation d'une micromole d'oxygène.

Le NADH résiduel est, soit oxydé par l'intermédiaire de la peroxydase, soit conservé en tant que tel dans la solution. Cette hypothèse est pourtant peu probable, puisque le NADH est peu stable en solution aqueuse acide.

1.4. Evolution du pouvoir réducteur, au cours de l'auto-oxydation d'une moutarde enrichie en $NADH,H^+$

Nous avons suivi le devenir du NADH dans une suspension de moutarde à 20 % (p/v) par absorption spectrophotométrique à 340 nm. L'oxydation du nucléotide donne lieu à un processus en deux étapes, l'une très rapide de l'ordre de 30 min se traduit par la disparition de près d'un tiers de la quantité de $NADH,H^+$ ajouté ; la seconde, plus lente, se poursuit à vitesse constante. La quantité résiduelle au bout de 6 heures d'auto-oxydation est voisine de 0,6 mmol/l de suspension (soit 3,3 µmol/g de moutarde).

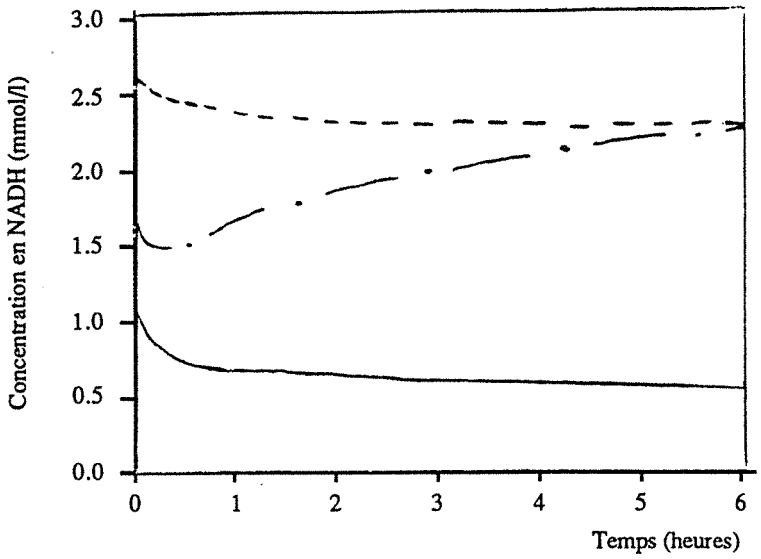


Figure 61 : Evolution simultanée de la teneur en NADH et du pouvoir réducteur d'une moutarde enrichie en nucléotide réduit.

———— Concentration résiduelle en NADH (mmol NADH/l).

– – – – – Pouvoir réducteur de la moutarde enrichie en NADH (en mmol équivalents NADH/l. Déterminé au ferricyanure de potassium).

— • — Pouvoir réducteur d'une moutarde fraîche, en l'absence d'additif (Déterminé au ferricyanure de potassium. Sert de référence).

Milieu réactionnel : Extrait de moutarde à 20% en tampon acétate pH 3,8, après centrifugation à 10 000g et filtration.
NADH ajouté en début de réaction à raison de 1 mmol/l

Le pouvoir réducteur de la moutarde enrichie en NADH, H^+ suit la disparition du NADH. Il se stabilise vers 4 heures à une valeur voisine de celle de la moutarde fraîche, sans additif (Figure 61).

Le pouvoir réducteur de la moutarde enrichie en NADH,H^+, exprimé en équivalent NADH, peut être considéré comme la résultante du pouvoir réducteur propre à la moutarde, correspondant à l'oxydation par le ferricyanure des composés réducteurs de la moutarde, et de la concentration résiduelle en NADH,H^+ dans le milieu réactionnel.

Au cours de l'oxydation, le pouvoir réducteur imputable au NADN,H^+ diminue. Au bout de 6 heures de réaction, cette diminution est évaluée à un tiers du pouvoir réducteur initial. Parallèlement, la concentration en NADH diminue de 0,44 mol/l (soit 4/9). La différence semble indiquer que la moutarde subit également des modifications entraînant une légère augmentation de son pouvoir réducteur, augmentation qui compenserait légèrement la diminution de pouvoir réducteur imputable à la disparition du NADH.

Dans ces conditions, le NADH semble manifester un effet protecteur vis-à-vis des constituants de la moutarde. Le comportement observé est à rapprocher de celui observé, dans les mêmes conditions avec l'acide ascorbique (Figure 34).

1.5. Etude de la formation de H_2O_2 au cours de l'oxydation du NADH

Par ailleurs, nous avons suivi spectrophotométriquement l'évolution de l'activité peroxydasique dans un extrait aqueux de moutarde, selon la technique de MÄDER & coll (1982), en présence de NADH et à 340 nm. Dans ces conditions, on observe une diminution rapide du NADH, H^+ qui est en accord avec les résultats du suivi de l'autooxydation à l'Oxygraphe et au respiromètre.

La détermination de l'activité peroxydasique correspondante a été établie en utilisant le gaïacol comme substrat. Pour cela on ajoute 5 µmol de gaïacol dans le milieu réactionnel, au bout de 10 min de réaction. L'absence de formation du produit d'oxydation (λ max = 470 nm) tendrait à faire admettre l'absence d'activité peroxydasique (Figure 62).

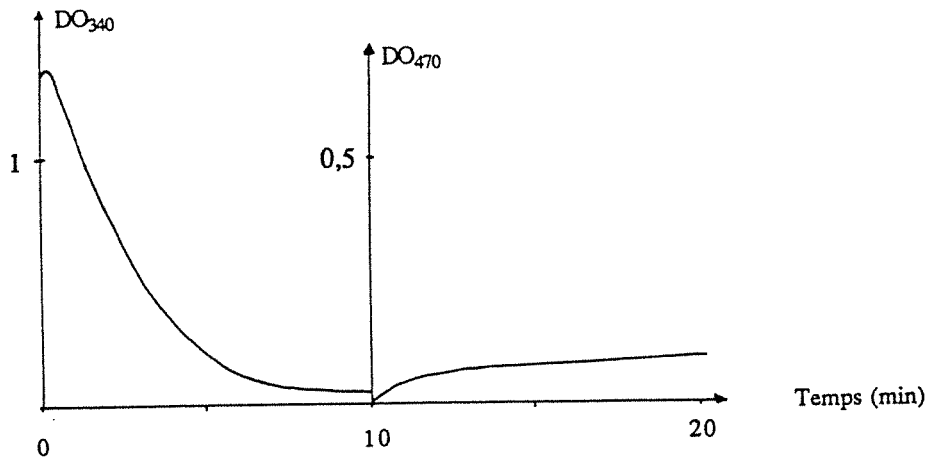


Figure 62 : Activité peroxydasique de la moutarde fraîche.
Etude de la cinétique d'oxydation du NADH (mesurée à 340 nm) et de la réduction du peroxyde d'hydrogène (déterminée par formation de tétragaïacol à 470 nm).

Milieu réactionnel :	Tampon acétate pH 3,8 ; 0,05 mol/l	0,860 ml
	NADH 10 mmol/l en tampon acétate	0,020 ml
	$MnCl_2$ 1 mol/l en tampon acétate	0,020 ml
Au temps "0", on ajoute : Extrait de moutarde non sulfitée à 20% en tampon acétate		0,100 ml
Au bout de 10 min, on suit l'évolution ce la D.O. à 470 nm, après addition au mélange réactionnel de :		
	Gaïacol 200 mmol/l dans éthanol 10%	0,025 ml
	Extrait de moutarde à 20% en tampon acétate	0,100 ml

Or, lorsqu'on ajoute du peroxyde d'hydrogène à la moutarde, en présence de gaïacol, l'activité peroxydasique est mise en évidence. Il est donc probable que le peroxyde d'hydrogène formé au cours de cette réaction ait réagi avec certains constituants de la moutarde.

Ces résultats tendent apparemment à confirmer la présence d'une faible quantité de peroxyde d'hydrogène résiduel.

Nous avons également observé que, quand la suspension de moutarde à 20 % (p/v) est abandonnée à l'air pendant quelques jours à 4° C, elle retrouve les mêmes propriétés prooxydantes qu'une moutarde fraîche vis-à-vis du NADH.

Les peroxydases des plantes supérieures sont des enzymes à fer, comprenant une ferriporphyrine III (hématine) comme groupement prosthétique. La peroxydase, partiellement dénaturée peut être en partie régénérée ou manifester des propriétés oxydatiques imputables à l'hème libéré. L'activité de l'enzyme régénérée est difficilement distingable de l'activité peroxydasique propre (VAMOS-VIGYAZO, 1981) (Figure 30).

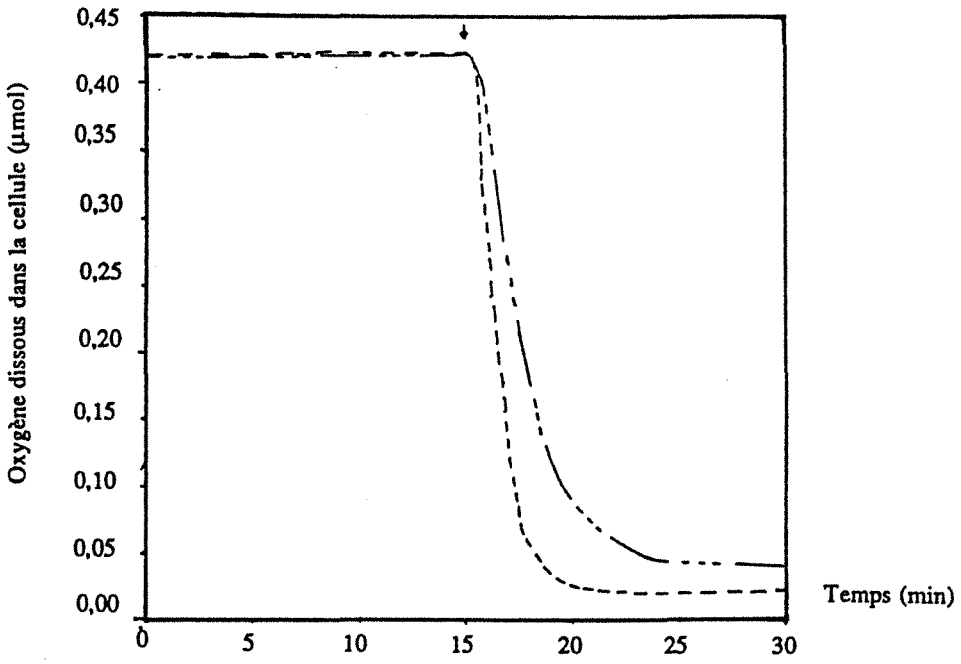


Figure 63 : Oxydation du NADH dans une moutarde non sulfitée ancienne (10 mois). Mesure à l'Oxygraphe après aération de la suspension de moutarde pendant 2 jours.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

____	Moutarde fraîche	: 2 ml	
	$MnCl_2$ 4 mM	: 75 µl	
	NADH	: 2,5 µmol	(soit 7 µmol/g)
_ _ _ _	Moutarde de 10 mois	: 2 ml	
	$MnCl_2$ 4 mM	: 75 µl	
	NADH	: 1,25 µmol	(soit 3,5 µmol/g)
	Addition du NADH	——>	

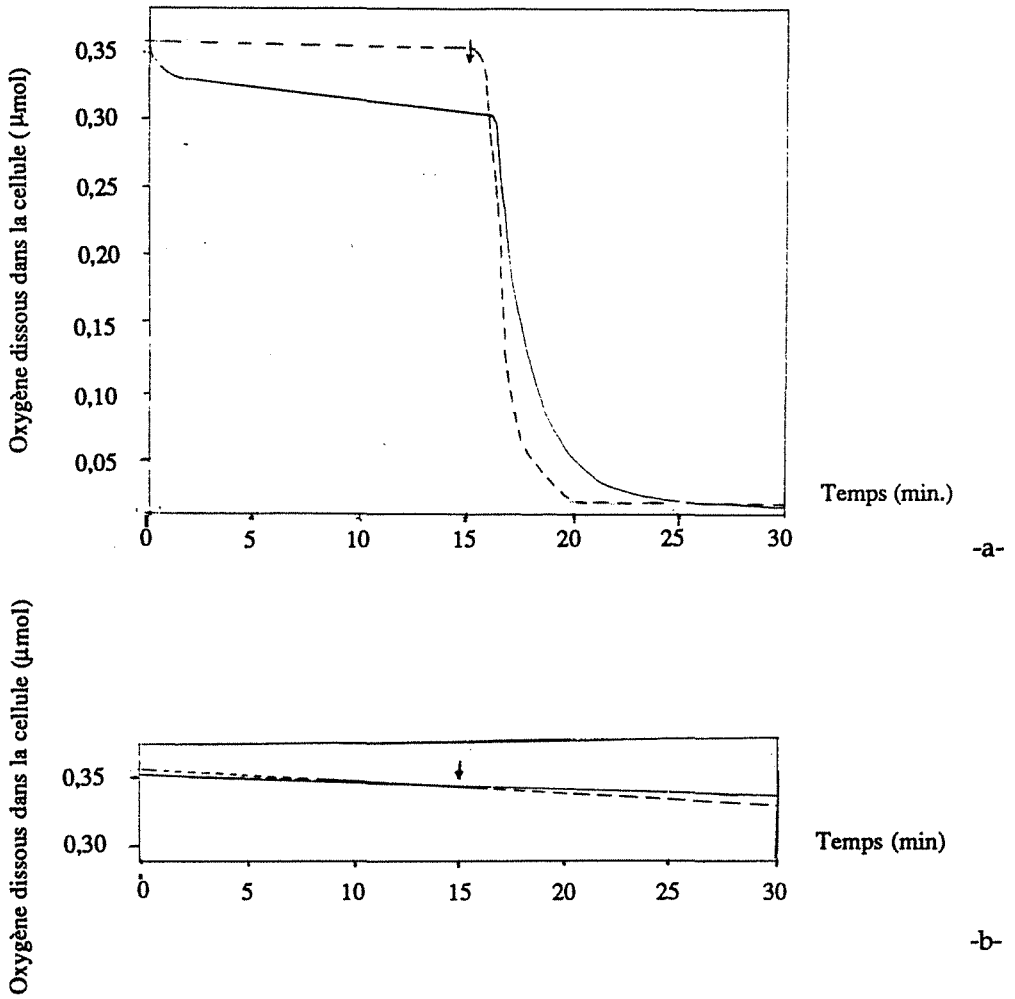


Figure 64 : Oxydation du NADH dans des moutardes fraîchement fabriquées (a) et entreposées pendant 10 mois (b). Comparaison à l'Oxygraphe entre une moutarde sulfitée et non sulfitée.

Moutarde à 20% (p/v) en tampon acétate de pH 3,8 ; 0,05 mol/l.

———— Moutarde non sulfitée fraîche : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 75 µl

- - - - - Moutarde sulfitée fraîche : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 75 µl

———— Moutarde non sulfitée agée de 10 mois : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 75 µl

- - - - - Moutarde sulfitée agée de 10 mois : 2 ml
$MnCl_2$ 4 mM : 75 µl

⟶ Addition duNADH : 1,25 µmol (soit 3,5 µmol/g)

Si la peroxydase est active, en présence du peroxyde d'hydrogène formé au cours de l'autooxydation de la moutarde, elle entraîne la dégradation de $NADH,H^+$. Or, ce réducteur est oxydé selon un processus lent. Le phénomène est peut-être lié à la présence de peroxyde d'hydrogène à des concentrations catalytiques ou à la manifestation d'une activité peroxydatique de la peroxydase entraînant une consommation accrue d'oxygène moléculaire, après aération.

Ce comportement a été observé à la fois sur moutarde sulfitée et sur moutarde non sulfitée ; dans ces conditions, il est donc difficile de mettre en cause la modification de structure de l'enzyme par action des sulfites (Figure 64).

Selon HAISMAN (1974), les sulfites empêchent l'apparition de faux-goûts liés à l'action peroxydasique, mais ne réduisent que partiellement la régénération de l'enzyme. La mise en évidence de l'oxydation rapide des sulfites dans la moutarde (Chapitre 1), en présence d'oxygène moléculaire en quantité non limitante, pendant la phase de régénération, permet d'expliquer l'analogie de comportement entre les moutardes sulfitée et non sulfitée.

Lorsque la peroxydase est active, les sulfites semblent réagir en détruisant le peroxyde d'hydrogène plus rapidement que ne le fait la peroxydase, selon l'équation :

$$SO_2 + H_2O_2 \longrightarrow SO_3 + H_2O$$

La réaction peroxydasique à l'égard du peroxyde d'hydrogène, catalysée par la peroxydase, est ainsi compétitivement diminuée.

La présence de sulfite ne modifie pas le comportement de la moutarde vis-à-vis du NADH. Ceci peut être dû au fait que le peroxyde d'hydrogène n'est nécessaire à la réaction peroxydasique qu'à doses catalytiques.

On peut aussi penser que le SO_2 ajouté à la moutarde est générateur de radicaux libres (Chapitre 1). La présence d'oxygène moléculaire dans le milieu favorise encore la présence d'anions superoxyde. Or, ces radicaux interviennent également dans l'oxydation du NADH.

2. Recherche de l'activité peroxydasique

Nous avons voulu observer le comportement de la POD endogène de moutarde, après extraction partielle au tampon acétate. Seule la fraction soluble de l'enzyme est étudiée, dans ces conditions.

L'activité est mesurée par spectrophotométrie, par l'intermédiaire de l'oxydation de l'ortho-dianisidine.

2.1. Evolution de l'activité POD au cours de la conservation d'une moutarde sulfitée.

Nous avons suivi l'activité enzymatique dans les surnageants de différentes moutardes d'âges variables et contenant des sulfites. L'activité est comparée à celle d'une moutarde fraîche, non sulfitée.

On observe dans un premier temps, sur une moutarde de 23 mois, une diminution de l'activité peroxydasique par rapport à celle de la moutarde fraîche. La vitesse initiale de la réaction et la quantité finale de substrat oxydé (ortho-dianisidine oxydée) sont plus faibles. Ces observations peuvent traduire la manifestation d'un effet protecteur du SO_2 vis-à-vis de l'autooxydation de la moutarde ou la mise en évidence d'une dénaturation partielle de la peroxydase (Figure 65).

En revanche, on constate que cet effet est moins marqué au cours du temps puisque la vitesse d'oxydation de l'ortho-dianisidine par la POD est plus élevée pour une moutarde dont le temps de conservation atteint 7 ans d'âge.

Tout se passe comme si l'enzyme était inactivée au cours de l'entreposage. L'augmentation de la vitesse d'oxydation de l'ortho-dianisidine peut être, dans le cas d'une moutarde âgée de 7 ans, attribuée à la manifestation d'une activité peroxydatique. Il ne nous a pas été possible, ne disposant pas d'une moutarde non sulfitée conservée dans les mêmes conditions pendant une période équivalente, de discerner un effet éventuel des sulfites sur la modification des activités peroxydasique ou peroxydatique de la moutarde.

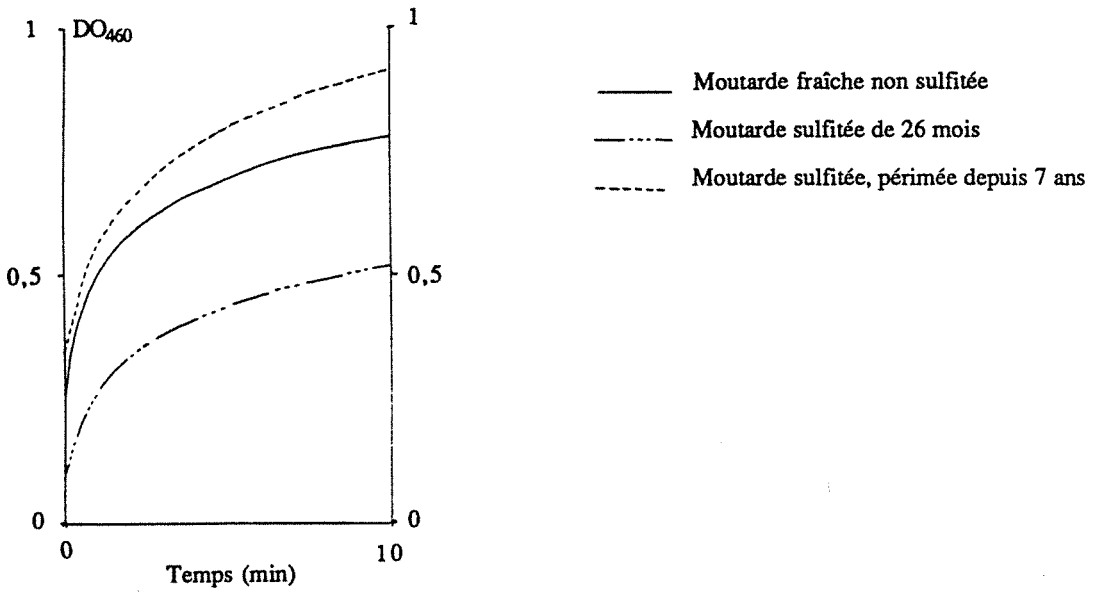


Figure 65 : Activité peroxydasique au cours du vieillissement de la moutarde sulfitée.

Substrat : Orthodianisidine ; Extrait enzymatique : extrait de moutarde à 20% en tampon acétate de pH 3,8, après centrifugation à 10 000 g puis filtration; Détermination : λ max = 460 nm.

Type de moutarde	v_i (Δ D.O.460 nm/min.)
Moutarde fraîche	1,20
Moutarde sulfitée âgée de 26 mois	0,80
Moutarde sulfitée, périmée depuis 7 ans	1,20

Tableau 24 : Evolution de l'activité peroxydasique au cours du vieillissement d'une moutarde sulfitée. Comparaison avec celle d'une moutarde fraîche (Figure 65).

2.2. Evolution de l'activité POD des moutardes oxydées artificiellement ou maintenues sous azote.

Nous avons tenté également d'étudier le comportement et de suivre l'inactivation de la POD de la moutarde dans des conditions d'autooxydation accélérée . Pour cela, la moutarde est oxydée sous forte pression d'oxygène (100 bars), respectivement à 20° et 50° C, ou maintenue sous azote, dans les mêmes conditions de température.

2.2.1. Activité POD d'une moutarde auto-oxydée à 50° C.

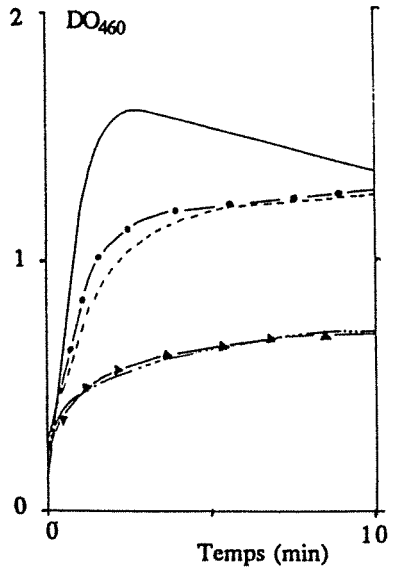
2.2.1.1. Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars)

L'activité POD est déterminée sur une moutarde soumise à auto-oxydation pendant 7 jours. Après une journée d'oxydation à 50° C, la moutarde prend une coloration nettement brune, qui s'intensifie encore par la suite.

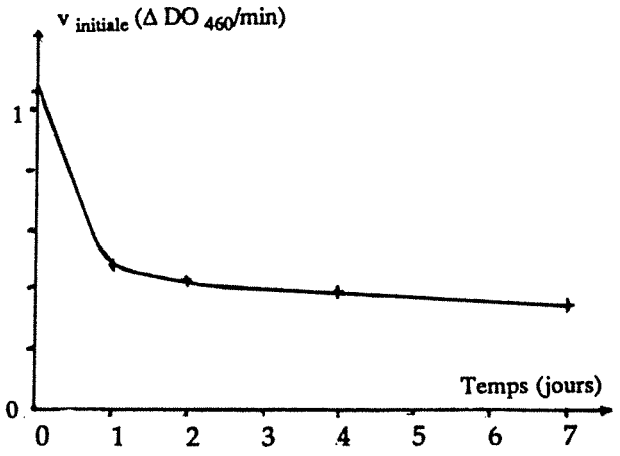
Dans ces conditions, on observe une nette diminution de l'activité POD, au bout d'une journée seulement d'autooxydation. La vitesse initiale de la réaction ainsi que la quantité finale d'orthodianisidine oxydée sont significativement plus faibles.

Une partie de l'enzyme semble dénaturée. La formation d'une quantité plus faible du produit de la réaction (ortho-dianisidine oxydée) peut s'expliquer aussi par une dégradation accrue du H_2O_2 formé. Les paramètres cinétiques de l'enzyme peuvent être également modifiés, ce qui peut entraîner une diminution d'affinité de la POD pour H_2O_2 et l'orthodianisidine.

En revanche, l'accroissement significatif de la coloration de la moutarde au bout d'une journée tend à montrer que le brunissement n'est pas uniquement de nature enzymatique car, en même temps, on assiste à une diminution rapide de l'activité peroxydasique.



Activité peroxydasique de la moutarde non sulfitée
Evolution au cours de l'oxydation à 50°C.
Détermination à 460 nm.



Cinétique de dénaturation de l'activité peroxydasique de la moutarde non sulfitée.au cours de l'auto-oxydation sous pression d'O_2, à 50°C.

Figure 66 : Etude de l'évolution de l'activité peroxydasique dans une moutarde non sulfitée, maintenue sous pression d'oxygène (100 bars) et à 50°C.

—— Moutarde fraîche
——• Moutarde autooxydée pendant 1 jour
- - - - Moutarde autooxydée pendant 2 jours
— - - - Moutarde autooxydée pendant 4 jours
——▲ Moutarde autooxydée pendant 7 jours

Substrat : Orthodianisidine ; Extrait enzymatique : extrait de moutarde à 20% en tampon acétate de pH 3,8, après centrifugation à 10 000 g puis filtration; Détermination : λ max = 460 nm.

	Vitesse initiale (Vi) (unité DO/min)	Activité résiduelle Vi / Vi fraîche	DO maximale (unité DO)
Moutarde fraîche	1,05	/	1,36
Moutarde à J+1	0,48	46 %	1,29
Moutarde à J+2	0,43	42 %	1,26
Moutarde à J+4	0,39	37 %	0,71
Moutarde à J+7	0,34	32 %	0,70

Tableau 25 : Evolution de l'activité peroxydasique d'une moutarde non sulfitée, au cours de l'autooxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C.

2.2.1.2. Moutarde autooxydée sous pression d'air (0,5 bars).

Comparativement, les essais effectués à 50° C sous une pression d'air de 0,5 bars (pression partielle en oxygène = 1/5) tendent à confirmer l'importance de l'oxygène dans le processus d'inactivation de la POD. Dans ces conditions en effet, la dénaturation est nettement moins marquée et la quantité de produit d'oxydation formé (orthodianisidine oxydée) n'est pratiquement pas modifiée, malgré la température élevée. En revanche, on n'observe plus d'activité peroxydasique dans une moutarde non sulfitée maintenue ainsi pendant 60 jours.

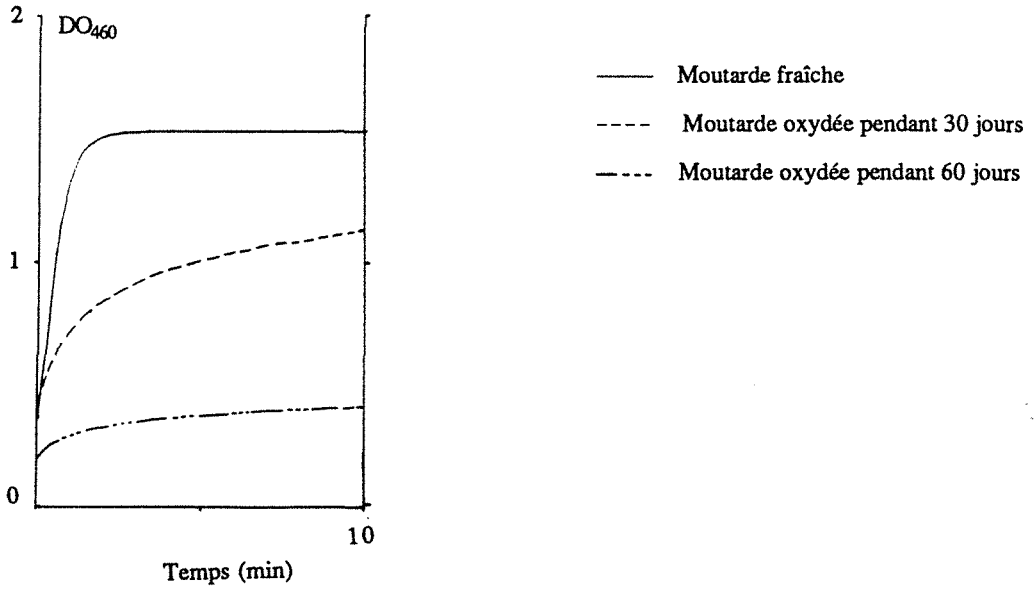
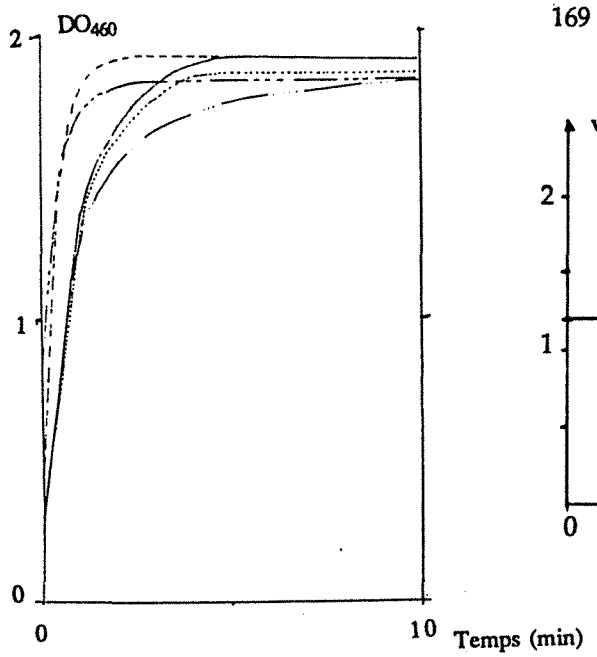


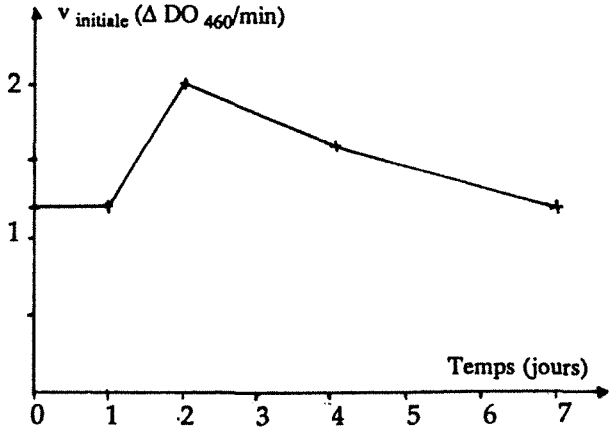
Figure 67 : Activité peroxydasique d'une moutarde non sulfitée maintenue sous air comprimé (0,5 bar), à 50°C.

2.2.2. Activité d'une moutarde oxydée à 20° C, sous pression d'oxygène (100 bars).

L'oxydation de la moutarde se traduit, dès le premier jour, par l'apparition d'une couleur grisâtre, correspondant à la fois à une disparition de la coloration jaune spécifique de la moutarde et au développement d'un brunissement progressif. Toutefois, la couleur brune ainsi obtenue est nettement moins importante que dans une moutarde oxydée sous pression



Activité peroxydasique de la moutarde non sulfitée
Evolution au cours de l'oxydation à 20°C.
Détermination à 460 nm.



Evolution de la vitesse de l'activité peroxydasique au cours de l'auto-oxydation.

Figure 68 : Evolution de l'activité peroxydasique dans une moutarde non sulfitée, au cours de l'oxydation sous pression d'oxygène pur (100 bars) et à 20°C.

——— Moutarde non sulfitée fraîche
..... Moutarde autooxydée pendant 1 jour
- - - - - - - Moutarde autooxydée pendant 2 jours
— - - - — Moutarde autooxydée pendant 4 jours
— · · · — Moutarde autooxydée pendant 7 jours

Substrat : Orthodianisidine ; Extrait enzymatique : extrait de moutarde à 20% en tampon acétate de pH 3,8, après centrifugation. à 10 000g puis filtration ; Détermination : λ max = 460 nm.

	Vitesse initiale (Vi) (unité DO/min)	Vi/ Vi fraîche	DO maximale (unité DO)
Moutarde fraîche	1,2	/	1,91
Moutarde à J + 1	1,2	100 %	1,86
Moutarde à J + 2	2,0	167 %	1,91
Moutarde à J + 4	1,6	133 %	1,83
Moutarde à J + 7	1,2	100 %	1,82

Tableau 26 : Evolution de l'activité peroxydasique d'une moutarde non sulfitée, au cours de l'autooxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C (Figure 68).

d'oxygène pur, à 50° C, ce qui montre bien que le brunissement de la moutarde est un processus qui dépend à la fois de la température et de la concentration en oxygène dissous.

L'activité peroxydasique est également moins affectée (Tableau 26).

Paradoxalement, la vitesse initiale de la réaction peroxydasique s'accroît, passe par un maximum au bout de deux jours puis décroît avant de retrouver sa valeur initiale après 7 jours d'oxydation.

La quantité finale d'ortho-dianisidine oxydée est sensiblement la même dans tous les échantillons.

Nous n'avons pas d'explication pour le moment, permettant d'interpréter le comportement de la peroxydase, dans ces conditions.

2.2.3. Activité d'une moutarde maintenue sous azote à 50° c.

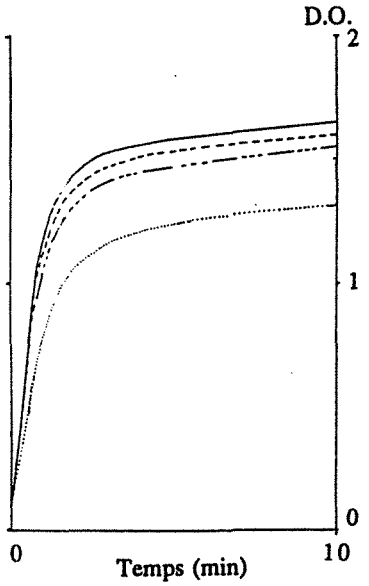
Si la moutarde est maintenue sous azote durant 7 jours, on n'observe aucune modification de couleur de la pâte.

La diminution linéaire durant 7 jours de la vitesse initiale de l'activité POD dans une moutarde maintenue sous azote traduit l'existence d'un processus de dénaturation de l'enzyme, cependant que la vitesse de réaction de brunissement de la moutarde est pratiquement nulle.

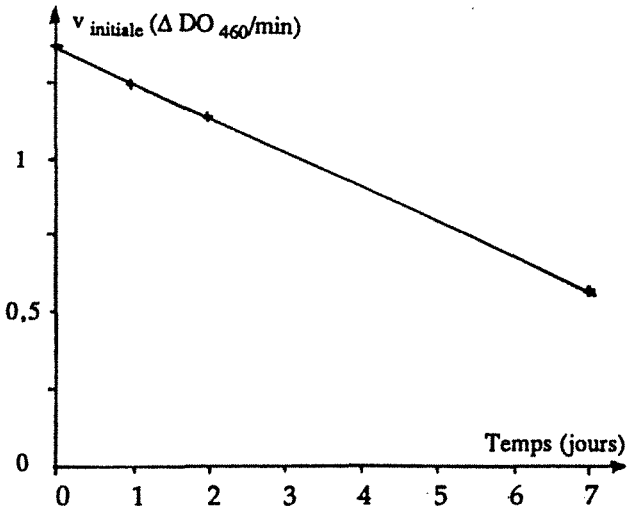
Il est surprenant toutefois de constater que l'enzyme, pour une même température (50°C) semble plus déstabilisée sous atmosphère d'azote que sous pression d'oxygène (100 bars).

2.3. Conclusion.

Ces observations mettent en évidence l'importance de la température dans le processus de dénaturation de la peroxydase. Ce phénomène n'est pas surprenant pour une enzyme, en revanche, il est plus original de constater que la composition de l'atmosphère mise en contact avec la moutarde présente une importance plus grande encore.



Activité peroxydasique de la moutarde non sulfitée. Détermination de l'actiivté POD par oxydation de l'orthodianisidine (λmax = 460 nm)



Dénaturation de la peroxydase de moutarde au cours du temps. Moutarde non sulfitée maintenue sous pression d'azote (0,5 bars) et à 50°C

Figure 69 : Evolution simultanée de l'activité peroxydasique et de la couleur (λ max = 430 nm) d'une moutarde maintenue à 50°C, sous azote.

——— Moutarde fraîche
- - - - - Moutarde maintenue sous azote pendant 1 jour
— - - Moutarde maintenue sous azote pendant 2 jours
. . . . . Moutarde maintenue sous azote pendant 7 jours

	Vitesse initiale (Vi) (unité DO/min)	Activité résiduelle Vi / Vi fraîche	DO maximale (unité DO)
Moutarde fraîche	1,38	100 %	1,66
Moutarde à J + 1	1,25	91 %	1,61
Moutarde à J + 2	1,14	83 %	1,56
Moutarde à J + 7	0,58	42 %	1,31

Tableau 27 : Evolution de l'activité peroxydasique d'une moutarde non sulfitée, maintenue sous azote (0,5 bars), à 20°C (Figure 69).

Dans les moutardes maintenues à 50°C, les propriétés cinétiques de la peroxydase sont très différentes selon que la moutarde
- est oxydée sous pression élevée (100 bars) ou sous pression partielle (0,1 bars) d'oxygène
- est maintenue sous saturation d'azote, à pression atmosphérique.

A 50°C, sous azote, l'activité diminue selon une cinétique du premier ordre. Cette diminution d'activité met en jeu une dégradation de la peroxydase, de caractère thermique.

En revanche, dans une moutarde auto-oxydée sous pression d'oxygène de 100 bars et à 50°C, on observe une dégradation rapide de la peroxydase avec, peut être, passage de l'enzyme d'une forme peroxydasique vraie à une forme dégradée, douée de propriétés peroxydatiques.

D'autres enzymes sont également connues pour leur participation au brunissement enzymatique, leur recherche nous a paru intéressante.

II. AUTRES ACTIVITES ENZYMATIQUES

1. Activité polyphénoloxydasique

Les polyphénoloxydases jouent un rôle très important dans les réactions de brunissement enzymatique.

Ces enzymes sont très répandues dans le monde végétal. Elles catalysent deux types de réactions complémentaires : d'une part l'hydroxylation des monophénols en orthodiphénols et, d'autre part, l'oxydation des orthodiphénols en orthoquinones. Elles peuvent oxyder accessoirement l'acide ascorbique et le NADH, par l'intermédiaire des cycles redox quinones-quinols (VAMOS-VIGYAZO, 1981).

L'activité PPO a été recherchée dans un extrait de moutarde fraîche par l'intermédiaire de l'oxydation du catéchol à 470 nm, d'une part et par l'étude de l'inhibition de l'oxydation de l'orthodianisidine en présence de tropolone (cf. Matériel et Méthodes), d'autre part. Nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence la présence d'une activité PPO dans la moutarde, ce qui confirme les résultats déjà obtenus par ROSTEIN (1982).

2. Activité lipoxygénasique

L'étude à l'Oxygraphe de l'activité lipoxygénasique (cf. Matériel et Méthodes) a par ailleurs montré que l'enzyme n'était pas décelable dans la moutarde fraîche, sulfitée ou non sulfitée, malgré la teneur élevée en lipides insaturés, facilement autooxydables.

ROSTEIN (1982) a obtenu des résultats identiques.

Ces résultats montrent que la manifestation d'un brunissement enzymatique sera essentiellement dépendante de l'activité peroxydasique de la moutarde.

Le brunissement de la pâte de moutarde dépend essentiellement de l'activité peroxydasique et des réaction d'Amadori faisant intervenir sucres réducteurs et composés aminés.

III. ETUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

1. Mise en évidence de la transformation des phénols.

A priori, on peut conclure que le brunissement dont la moutarde fait l'objet est un processus de nature oxydasique ou oxydatique. Les observations précédentes ont confirmé la participation de la peroxydase aux processus d'autooxydation, sans pouvoir toutefois conclure en faveur d'un mécanisme bien défini. Afin de préciser la nature du processus de polycondensation oxydative qui conduit à la formation des pigments bruns, il nous a paru nécessaire d'étudier en premier lieu les effets de l'autooxydation sur les principaux constituants polyphénoliques de la pâte de moutarde.

Pour cela, nous avons été amenés à comparer la composition phénolique d'une moutarde autooxydée sous pression d'oxygène avec celle d'une moutarde maintenue sous azote.

1.1. Extraction et identification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont extraits à partir d'une moutarde délipidée, selon la méthode de KRYIER & coll (1981) (cf. Matériel et Méthodes). Cette méthode permet de séparer d'une part les composés phénoliques libres, d'autre part les phénols issus de l'hydrolyse des esters solubles et, enfin, les composés phénoliques issus des esters insolubles.

1.2. Moutarde oxydée sous oxygène

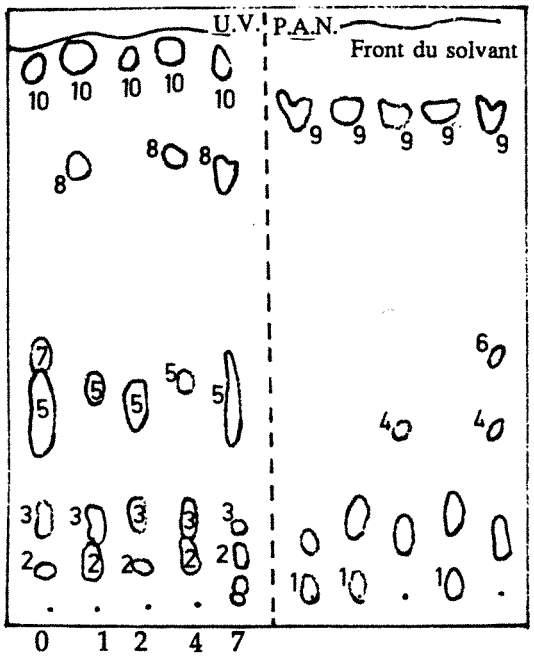
Les premiers résultats permettent de constater que les composés phénoliques sont essentiellement présents dans la fraction esters solubles. Une faible proportion de phénols libres est détectée ; en revanche, les esters insolubles semblent inexistants ou présents en quantité trop faible pour être identifiés.

Ces observations sont valables aussi bien pour la moutarde fraîche que pour la moutarde oxydée ou maintenue sous azote.

1.2.1. Analyse de la fraction "Composés phénoliques libres"

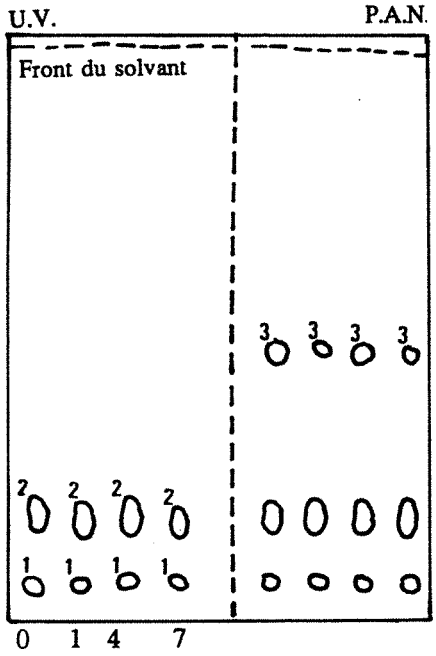
La chromatographie de partage sur cellulose (papier ou couche mince) (cf. Matériel et Méthodes) de la fraction "Composés phénoliques libres" permet de mettre enévidence jusqu'à 5 composés phénoliques, avec les deux systèmes de solvants d'élutions utilisés : Acide acétique à 2% (p/v) et Isopropanol/Ammoniaque/Eau (8:1:1, v/v/v).

L'acide sinapique est le principal acide phénol contenu dans cette fraction. L'acide férulique a pu également être identifié avec les deux solvants précédents (cf. Figure 70, 71). Ces acides sont néanmoins présents en faible quantité, ce qui en rend l'identification malaisée. D'autres composés n'appartenant pas à la famille des phénols ont pu être révélés en lumière U.V. sans que pour autant nous ayons cherché à les identifier.



Chromatographie sur cellulose (Papier Whatman n°1) de la fraction "Composés phénoliques libres" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C, pendant 7 jours.

Solvant : IsoPropOH/NH_4OH/Eau (8:1:1, v/v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.



Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques libres" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 70 : Séparations chromatographiques de la fraction "Composés Phénoliques Libres" d'une moutarde non sulfitée autooxydée sous pression d'O_2 (100 bars) et à 20°C.

Extraits par le mélange éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v)

	Produit n° (Fig.70)	Rf	U.V.	U.V. + NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde non sulfitée fraîche	1	0,02	/	/	Beige	Brun-rose	Ac sinapique
	2	0,07	Bleu	Bleu	/	/	
	3	0,12	Bleu	Bleu	Beige	Brun-rose	
	5	0,39	Bl.-violet	Bl.-violet	/	/	
	7	0,46	Bleu	Bleu	/	/	
	9	0,84	/	/	Jaune	Jaune	
	10	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 1 jour	2	0,08	Bleu	Bleu	Jaune-beige	Beige	Ac sinapique
	3	0,14	Bleu	Bleu	Beige	Beige	
	5	0,38	Bleu	Bleu	/	/	
	8	0,77	Vert	Vert-orangé	/	/	
	9	0,84	/	/	Jaune	Jaune	
	10	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 2 jours	2	0,06	Bleu	Bleu	/	/	Ac sinapique
	3	0,13	Bleu	Bleu	Beige	Rosé	
	4	0,29	/	/	Beige	Beige	
	5	0,35	Bleu	Bl-violet	/	/	
	9	0,85	/	/	Jaune	Jaune	
	10	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 4 jours	1	0,02	/	/	Beige	Rosé	Ac sinapique
	2	0,08	Bleu	Bleu	Beige	Beige	
	3	0,14	Bleu	Bleu	Jaune-beige	Beige	
	5	0,38	Bleu	Bleu	/	/	
	8	0,77	Vert	Vert-orangé	/	/	
	9	0,84	/	/	Jaune	Jaune	
	10	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 7 jours		0,02	Bleu	Bleu	/	/	Ac sinapique
	2	0,08	Bleu	Bleu	/	/	
	3	0,13	Bleu	Bleu	Beige	Rosé	
	4	0,29	}		Beige	Rosé	
	5	0,36	} Bl-Vi.	Bl-violet	/	/	
	6	0,42	}		Beige	Rosé	
	8	0,76	Vert	Vert-orangé	/	/	Ac pOHbenz
	9	0,84	/	/	Jaune	Orange	
	10	0,96	/	Orange	/	/	

Tableau 28 : Caractéristiques chromatographiques et chromogéniques de la fraction "Composés Phénoliques Libres" extraite de la moutarde, maintenue sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C.

Séparation par chromatographie sur papier Whatmann n°1
Solvant d'élution : Isopropanol/Ammoniaque/Eau (8 : 1 : 1 ; v/v/v).

	Produit n° (Fig.70)	Rf	U.V.	U.V. + NH_3	P.A.N.	PAN/Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,43	/	/	Beige-rosé	Orange	
Moutarde oxydée 1 jour	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu-violet	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,44	/	/	Rose-orange	Orange	
Moutarde oxydée 4 jours	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu-violet	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,44	/	/	Rose-orange	Orange	
Moutarde oxydée 7 jours	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu-violet	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,41	/	/	Beige-rosé	Orange	

Tableau 29 : Caractéristiques chromatographiques et chromogéniques de la fraction "Composés Phénoliques Libres" extraite de la moutarde non sulfitée, oxydée sous pression d'oxygène (100 bars) et à 20°C.

Séparation sur couche mince de cellulose MN 300.
Solvant d'élution : Acide acétique 2% (v/v)

	Produit n° (Fig.71)	Rf	U.V.	U.V. + NH_3	P.A.N.	PAN/Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,43	/	/	Beige-rosé	Orange	
Moutarde oxydée 1 jour	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu-violet	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,44	/	/	Rose-orange	Orange	
Moutarde oxydée 4 jours	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu-violet	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,44	/	/	Rose-orange	Orange	
Moutarde oxydée 7 jours	1	0,02	Bleu	Bleu	Beige	Brun	Ac sinapique
	2	0,13	Bleu	Bleu-violet	Rose-violet	Gris-vert	
	3	0,41	/	/	Beige-rosé	Orange	

Tableau 30 : Caractéristiques chromatographiques et chromogéniques de la fraction "Composés phénoliques libres" extraite de la moutarde non sulfitée, oxydée sous pression d'oxygène (100 bars) et à 50°C.

Séparation sur couche mince de cellulose MN 300.
Solvant d'élution : Acide acétique 2% (v/v)

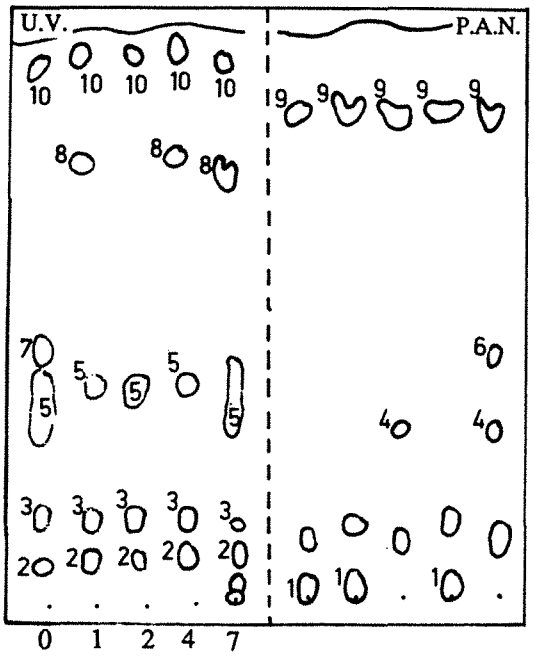
L'examen des différents chromatogrammes permet de confirmer par ailleurs que la distribution des acides phénoliques de la fraction "Composés phénoliques libres" est peu modifiée au cours de l'oxydation que l'on fait subir à la moutarde à 20 ou à 50° C.

Les premiers résultats sont en accord avec ceux trouvés sur les graines de *B. Juncea* par ROSTEIN (1982). D'autres études sur différentes graines de *Brassicaceae* ont également montré que l'acide sinapique est le principal acide phénol libre. KRYIER & coll. (1982) ont identifié, en outre, les acides férulique, syringique et para coumarique en quantités plus faibles, d'autres acides étant décelés à l'état de traces. KOZLOWSKA & coll. (1983) ont identifié également les acides caféique et para hydroxybenzoïque en quantités non négligeables dans différents cultivars de colza. En revanche, selon ces mêmes auteurs, l'acide sinapique n'est pas l'acide phénol libre principal de la graine de *Brassica hirta* (ou *Sinapis alba* = moutarde blanche). En effet, dans cette variété, c'est l'acide para-hydroxybenzoïque qui est l'acide phénol libre le plus largement représenté.

Les acides phénols ne sont, normalement, pas présents à l'état libre, dans les végétaux (HERRMANN, 1989). Selon SCHUSTER & HERRMANN (1985) et SCHULZ et HERMANN (1981), la présence d'acides hydroxybenzoïques dans divers extraits végétaux est liée à l'hydrolyse de certains flavonoïdes tels que les anthocyanes ou encore des hydroxybenzoyl glucosinolates par les alcalis ou des enzymes.

Les principaux acides phénols que nous avons mis en évidence par chromatographie sur couche mince de cellulose ou sur papier appartiennent à la classe des acides hydroxycinnamiques.

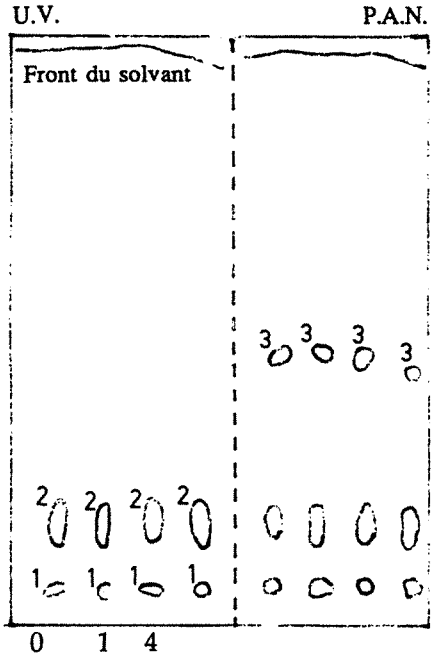
Dans ce contexte, on peut supposer que certains esters, solubles et insolubles, d'acides hydroxycinnamiques pourront faire l'objet d'une hydrolyse partielle, de nature chimique ou enzymatique.



Durée d'oxydation (jours)

Chromatographie sur cellulose (Papier Whatman n°1) de la fraction "Composés phénoliques libres" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C, pendant 7 jours.

Solvant : IsoProOH/NH_4OH/Eau (8:1:1, v/v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.



Durée d'oxydation (jours)

Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques libres" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 71 : Séparations chromatographiques de la fraction "Composés Phénoliques Libres" d'une moutarde non sulfitée autooxydée sous pression d'O_2 (100 bars) et à 50°C.

Extraits par le mélange éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v)

	Produit n° (Fig.71)	Rf	U.V.	U.V. + NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde non sulfitée fraîche	1	0,02	/	/	Beige	Brun-rose	Ac sinapique
	2	0,07	Bleu	Bleu	/	/	
	3	0,09	/	/	Beige	Brun-rose	
	4	0,15	Bleu	Bleu	/	/	
	6	0,39	Bl.-violet	Bl.-violet	/	/	
	8	0,46	Bleu	Bleu	/	/	
	10	0,84	/	/	Jaune	Jaune	
	11	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 1 jour	2	0,08	Bleu	Bleu	Jaune-beige	Beige	Ac sinapique
	4	0,14	Bleu	Bleu	Beige	Beige	
	6	0,38	Bleu	Bleu	/	/	
	9	0,77	Vert	Vert-orangé	/	/	
	10	0,84	/	/	Jaune	Jaune	
	11	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 2 jours	2	0,06	Bleu	Bleu	/	/	Ac sinapique
	3	0,11	/	/	Beige	Rosé	
	4	0,15	Bleu	Bleu	/	/	
	5	0,29	/	/	Beige	Beige	
	6	0,35	Bleu	Bl-violet	/	/	
	10	0,85	/	/	Jaune	Jaune	
	11	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 4 jours	2	0,08	Bleu	Bleu	Beige	Beige	Ac sinapique
	4	0,14	Bleu	Bleu	Jaune-beige	Beige	
	5	0,38	Bleu	Bleu	/	/	
	9	0,77	Vert	Vert-orangé	/	/	
	10	0,84	/	/	Jaune	Jaune	
	11	0,96	/	Orange	/	/	
Moutarde non sulfitée oxydée pendant 7 jours		0,02	Bleu	Bleu	/	/	Ac sinapique
	2	0,08	Bleu	Bleu	/	/	
	4	0,13	Bleu	Bleu	Beige	Rosé	
	5	0,29	} Bl-Vi.		Beige	Rosé	
	6	0,36		Bl-violet	/	/	
	7	0,42	}		Beige	Rosé	
	9	0,76	Vert	Vert-orangé	/	/	
	10	0,84	/	/	Jaune	Orange	Ac pOHbenz
	11	0,96	/	Orange	/	/	

Tableau 31 : Caractéristiques chromatographiques et chromogéniques de la fraction "Composés Phénoliques Libres" extraite de la moutarde, maintenue sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C.

Séparation par chromatographie sur papier Whatmann n°1
Solvant d'élution : Isopropanol/Ammoniaque/Eau (8 : 1 : 1 ; v/v/v).

La présence de ces acides libres ne peut être liée aux transformations éventuelles apportées par le procédé de fabrication puisque leur distribution semble conforme à celle qui a été observée dans les graines de moutarde (ROSTEIN, 1982).

Ajoutons que l'entreposage, même à température élevée (50° C), ne semble pas affecter la libération ultérieure de composés phénoliques. Il n'est pourtant pas exclu qu'un tel processus ne devienne sensible pour des périodes d'entreposage plus longues.

Les phénols libres ne sont pas transformés au cours de l'oxydation de la pâte de moutarde. Ce résultat est surprenant dans la mesure où les phénols libres sont forcément plus accessibles à l'oxydation que ne le sont les phénols estérifiés.

1.2.2. Analyse de la fraction "Esters phénoliques solubles".

L'analyse, après saponification, des composés phénoliques contenus dans la fraction esters solubles montre la présence de nombreux composés dont les propriétés s'apparentent à celles des acides phénols (fluorescence en U.V. et coloration par la P.A.N.). Parmi ces composés, nous avons pu identifier l'acide sinapique comme étant le plus représentatif de cette fraction. Les acides férulique et vanillique ont également été identifiés dans les mêmes conditions, à l'aide des deux systèmes d'élution précédents (cf. Mat. et Méthodes).

Le système Isopropanol/Ammoniaque/Eau révèle également la présence d'acide caféique en faible quantité. D'autres composés phénoliques séparés dans les mêmes conditions chromatographiques n'ont pu cependant être identifiés (cf. Figure 72, 73).

Dans les *Brassicaceae*, les principaux esters solubles identifiés sont issus de la condensation de l'acide sinapique avec des composés porteurs d'une fonction alcool (HERRMANN, 1989). Les observations que nous avons faites par chromatographie sur couche mince sont en accord avec ces résultats.

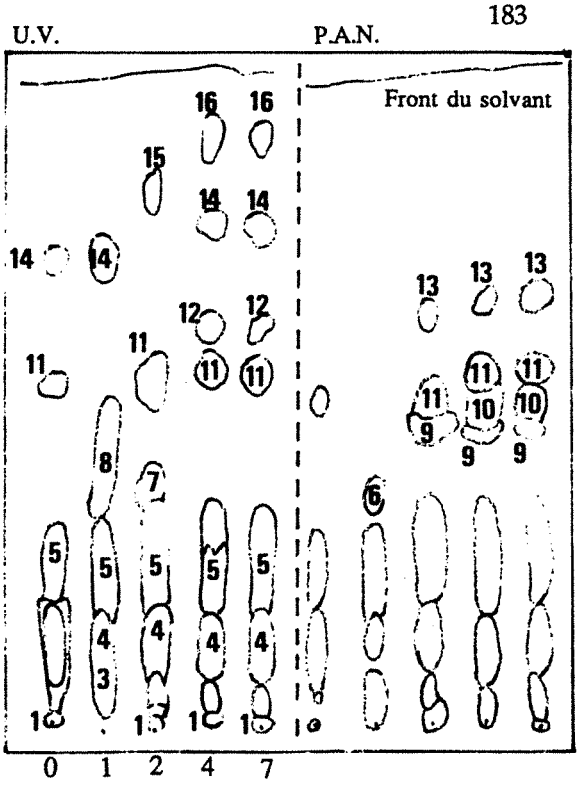
Le sinapoyl-glucose est, de loin, le plus abondant de ces esters. D'autres esters sont également particuliers au genre *Brassica*, la sinapine (sinapoyl-choline) est le plus connu ; elle est largement présente dans les différentes variétés de graines de moutarde (*B. Juncea, B. nigra* et *B. hirta*) ainsi que dans la pâte de moutarde (HENNING, 1982).

STENGEL et GEIGER (1976) puis TANTAWY & coll (1986) ont également identifié deux esters particuliers dans les graines de colza (*B. napus*) : le kaempférol 3-0-(sinapoyl-sophoroside)-7-0-glucoside et le kaempférol-3-0-(sinapoyl-glucoside)-7-0-sophoroside, en faibles quantités.

Les autres acides cinnamiques sont représentés sous forme d'acides cafeoyl-quiniques, dont l'acide chlorogénique, d'acides para-coumaroyl-quiniques et, dans une moindre proportion, d'acides féruloyl-quiniques. Des quantités importantes de féruloyl-glucose ont également été identifiées (HERRMANN, 1989). On peut signaler la découverte par TAMURA & coll. (1962) d' un ester d'acide gras constitué d'acide eicosanoïque (C_{20}) et d'acide férulique (eicosylférulique), dans *B. napus*.

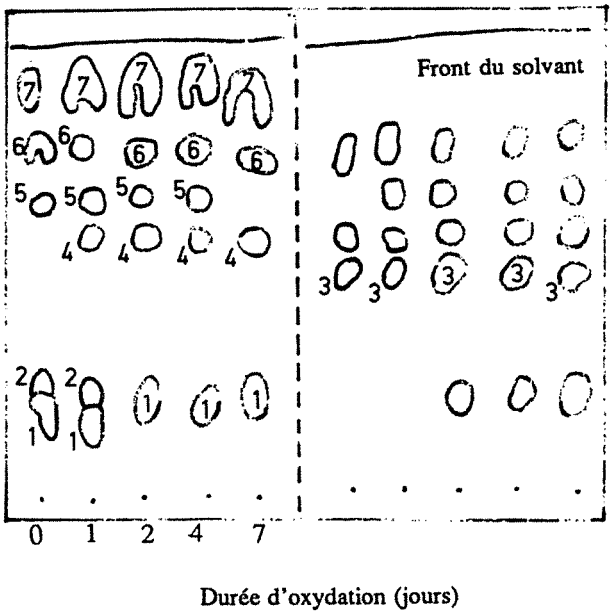
Quant aux acides hydroxybenzoïques, on les trouve essentiellement sous forme d'esters de glucose et de glucosides : para-hydroxybenzoïque-O-β-D-Glucoside, acide vanillique-O-β-D-Glucoside, para-hydroxybenzoyl-glucose (HERRMANN, 1989).

L'analyse chromatographique des phénols contenus dans les extraits de moutarde montre que l'oxydation modifie curieusement la répartition des acides phénoliques. Nous avons constaté en effet que l'acide sinapique, après une période d'oxydation de la moutarde d'une journée à 20° C ou à 50°, sous pression d'oxygène, était présent en quantité plus importante, sous forme d'esters solubles. En effet, par saponification de la fraction esters solubles, on observe la formation d'une quantité plus élevée d'acide sinapique.



Chromatographie sur papier (Papier Whatmann n°1) de la fraction "Composés phénoliques solubles" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C, pendant 7 jours.

Solvant : Isoprop./NH_4OH/Eau (8:1:1, v/v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.



Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques solubles" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 72 : Séparations chromatographiques de la fraction "Composés Phénoliques Solubles" d'une moutarde non sulfitée autooxydée sous pression d'O_2 (100 bars) et à 20°C.

Extraits par le mélange éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v)

	Produit n° (Fig.72)	Rf	U.V.	U.V. + NH_3	PAN	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,00	Orange	Orange	Beige (Be)	Be-rosé	
	2	0,05	Bleu (Bl)	Bleu	Rose	Bleu	
	3	0,10	Vert (Ve)	Vert-jaune	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,12	Bleu-Ve	Bleu-vert	Rose	Gris-Ve	Ac sinapique
	5	0,24	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
			Trainée	violette			
	11	0,52	Violet(Vi)	Violet	Beige	Rosé	Ac vanillique
	14	0,72	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant un jour	2	0,05	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Bl	
	3	0,09	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,14	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
	5	0,24	Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
	6	0,36	/	/	Rose	Gris-rosé	
	8	0,41	Violet	Violet	/	Gris-rosé	
	14	0,73	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant deux jours	1	0,00	Orange	Orange	Beige	Be-rosé	
	1	0,03	Orange	Orange	Beige	Brun-Be	
	2	0,06	Bleu-vert	Bleu-vert	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,14	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
	5	0,27	Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
	7	0,38	Violet	Violet	/	/	
	9	0,45	/	/	Rose	Mauve	
	11	0,51	Violet	Violet	Beige	Rose	Ac vanillique
	13	0,63	/	/	Beige	Beige-Bl	
	15	0,82	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant 4 jours	1	0,02	Orange	Orange	Rose	Gris-Bl	
	2	0,04	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,13	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
		0,24	)				
	5	0,27	) Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
		0,31	)				
	9	0,44	/	/	Rose	Mauve	
	10	0,48	/	/	Beige	Rose	
	11	0,54	Bleu	Bleu	Rose	Mauve	Ac vanillique
	12	0,60	Bleu	Bleu	/	/	
	13	0,65	/	/	Be-rosé	Beige-Bl	
	14	0,76	Bleu	Bleu	/	/	
	16	0,90	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant 7 jours	1	0,00	Orange	Orange	Brun-Be	Orange	
	2	0,03	Orange	Orange	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,13	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
	5	0,27	Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
	9	0,44	/	/	Rose	Mauve	
	10	0,48	/	/	Beige	Rose	
	11	0,54	Bleu	Bleu	Rose	Mauve	Ac vanillique
	12	0,60	Bleu	Bleu	/	/	
	13	0,65	/	/	Be-rosé	Beige-Bl	
	14	0,76	Bleu	Bleu	/	/	
	16	0,90	Bleu	Bleu	/	/	

Tableau 32 : Propriétés chromatographiques et chromogéniques des composés extraits de la fraction "Esters phénoliques solubles" de la moutarde au cours de l'oxydation sous oxygène (100 bars), à 20°C.

Séparation par chromatographie sur papier Whatmann n°1
Solvant : Isopropanol/Ammoniaque/Eau (8 : 1 : 1 ; v/v/v). Révélateur U.V./P.A.N.

	Produit n° (Fig.72)	Rf	U.V.	UV + NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange(Og)	Gris-vert	Ac sinapique
	2	0,26	Violet(Vi)	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	
	4	0,56	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	
	5	0,63	Vert	Vert	/	/	
	6	0,76	Jaune-vert	Vert	Rouille	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 1 jour	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-vert	Ac sinapique
	2	0,25	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Rose-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Brun-rose	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 2 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Orange	Gris-vert	Ac sinapique
	3	0,48	/	/	Orange	Rose Vi	
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-rosé	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 4 jours	1	0,21	Violet	Bleu-violet	Orange	Gris-vert	Ac sinapique
	3	0,48	/	/	Orange	Rose-Vi	
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-rosé	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée 7 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Rose-Vi	Gris-vert	Ac sinapique
	3	0,46	/	/	Rose Og	Rose Vi	
	4	0,55	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	/	/	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Beige-rosé	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	

Tableau 33 : Caractéristiques chromatographiques de la fraction "Esters phénoliques solubles" extraite de la moutarde non sulfitée, oxydée sous pression d'oxygène (100 bars) à 20°C.

Séparation sur couche mince de cellulose MN 300 avec l'acide acétique 2% (v/v) pour solvant d'élution.

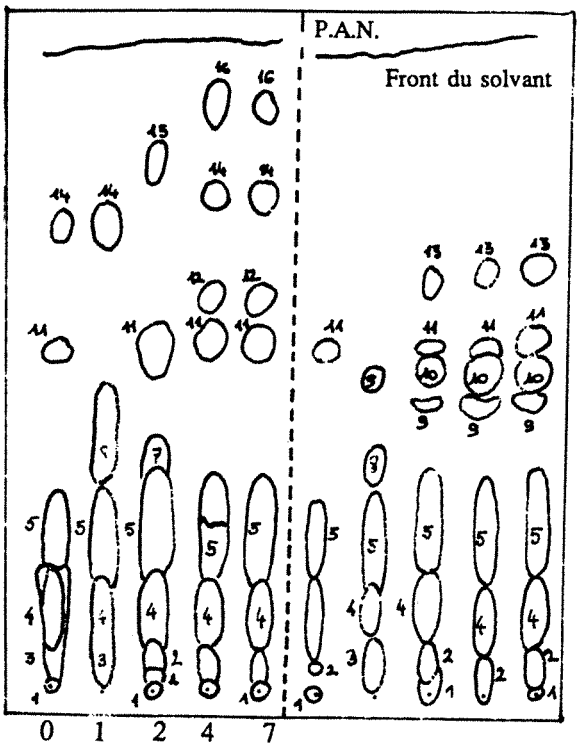
Une analyse chromatographique en phase gazeuse devrait permettre de vérifier s'il s'agit d'un artefact ou d'une transformation réelle d'une partie des esters insolubles en esters solubles.

La fraction esters insolubles contient, nous l'avons déjà dit, les mêmes esters que dans la fraction esters solubles, mais à des concentrations beaucoup plus faibles. Certains acides cinnamiques sont également liés à des polymères de la paroi cellulaire, c'est le cas des acides férulique et paracoumarique, liés aux polyosides (pentosanes, cellulose), et à la lignine (HERRMANN, 1989).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence, par chromatographie sur couche mince, les phénols engagés sous forme d'esters insolubles dans la pâte de moutarde. On ne peut donc pas, a priori, justifier par l'hydrolyse des esters insolubles la formation d'une quantité aussi importante d'acide sinapique au cours de l'oxydation des constituants de la moutarde.

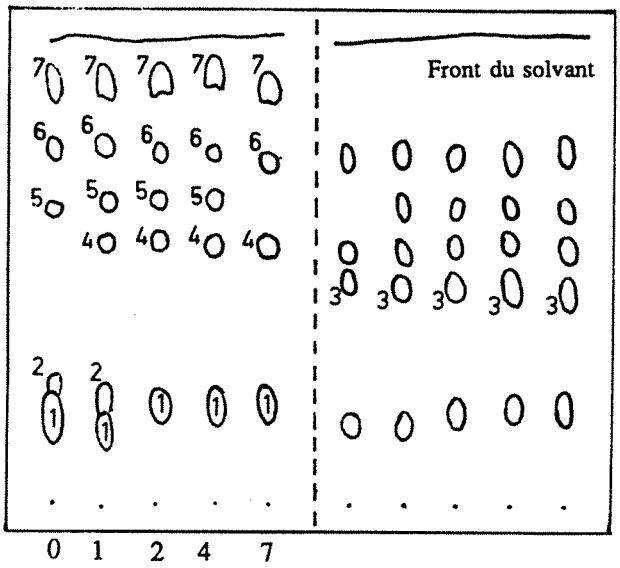
L'oxydation conduit également à la formation de composés de mêmes propriétés chromogéniques que les acides phénols, révélés en violet par le réactif P.A.N. + Na_2CO_3 après séparation sur papier Whatman n°1 par le solvant Isopropanol/Ammoniaque/Eau. L'intensité de la coloration des taches chromatographiques augmente au cours de l'oxydation. L'un des deux composés peut être assimilé à l'acide paracoumarique (Rf = 0.55, coloration violette en présence de P.A.N. + $Na_2 CO_3$). Le second, de même couleur, qui présente un Rf de 0.45, n'a pas été identifié, peut-être s'agit-il d'un isomère de l'acide para-coumarique.

Dans la littérature, il est mentionné que l'autooxydation peut conduire à l'hydroxylation des acides phénols. Elle peut être de nature non enzymatique, dans le cas de l'oxydation de l'acide paracoumarique en acide caféique. Selon les observations de TAKEUCHI et coll. (1989) la réaction a lieu uniquement en présence d'oxygène. Sur les systèmes modèles expérimentés, ces auteurs ont mis en évidence le rôle catalytique déterminant des ions Fe^{2+} lorsqu'ils sont chélatés par l'E.D.T.A. Ils ont également confirmé l'origine radicalaire de ces réactions et attribué la formation de ces radicaux



Chromatographie sur papier (Papier Whatmann n°1) de la fraction "Composés phénoliques solubles" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C, pendant 7 jours.

Solvant : Isoprop./NH_4OH/Eau (8:1:1, v/v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.



Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques solubles" extraite de la moutarde
Moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 73 : Séparations chromatographiques de la fraction "Composés Phénoliques Solubles" d'une moutarde non sulfitée autooxydée sous pression d'O_2 (100 bars) et à 50°C.

Extraits par le mélange éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v)

	Produit n° (Fig.73)	Rf	U.V.	U.V. + NH_3	PAN	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,00	Orange	Orange	Beige (Be)	Be-rosé	
	2	0,05	Bleu (Bl)	Bleu	Rose	Bleu	
	3	0,10	Vert (Ve)	Vert-jaune	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,12	Bleu-Ve	Bleu-vert	Rose	Gris-Ve	Ac sinapique
	5	0,24	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
			Trainée	violette			
	11	0,52	Violet(Vi)	Violet	Beige	Rosé	Ac vanillique
	14	0,72	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant un jour	2	0,05	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Bl	
	3	0,09	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,14	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
	5	0,24	Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
	6	0,36	/	/	Rose	Gris-rosé	
	8	0,41	Violet	Violet	/	Gris-rosé	
	9	0,45	/	/	Rose	Mauve	
	14	0,73	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant deux jours	1	0,00	Orange	Orange	Beige	Be-rosé	
		0,03	Orange	Orange	Beige	Brun-Be	
	2	0,06	Bleu-vert	Bleu-vert	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,14	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
	5	0,27	Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
	7	0,38	Violet	Violet	/	/	
	9	0,45	/	/	Rose	Mauve	
	11	0,51	Violet	Violet	Beige	Rose	
	13	0,63	/	/	Beige	Beige-Bl	
	15	0,82	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant 4 jours	1	0,02	Orange	Orange	Rose	Gris-Bl	
	2	0,04	Bleu	Bleu	Rose	Gris-Bl	Ac caféique
	4	0,13	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
		0,24	)				
	5	0,27	) Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
		0,31	)				
	9	0,44	/	/	Rose	Mauve	
	10	0,48	/	/	Beige	Rose	
	11	0,54	Bleu	Bleu	Rose	Mauve	
	12	0,60	Bleu	Bleu	/	/	
	13	0,65	/	/	Be-rosé	Beige-Bl	
	14	0,76	Bleu	Bleu	/	/	
	16	0,90	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde oxydée pendant 7 jours	1	0,00	Orange	Orange	Brun-Be	Orange	
	2	0,03	Orange	Orange	Rose	Gris-Bl	
	4	0,13	Bleu	Bleu	Rose	Bleu	Ac sinapique
	5	0,27	Bleu-Vi	Bleu-Vi	Rose	Gris-Ve	Ac férulique
	9	0,44	/	/	Rose	Mauve	
	10	0,48	/	/	Beige	Rose	
	6	0,54	Bleu	Bleu	Rose	Mauve	
	12	0,60	Bleu	Bleu	/	/	
	13	0,65	/	/	Be-rosé	Beige-Bl	
	14	0,76	Bleu	Bleu	/	/	
	16	0,90	Bleu	Bleu	/	/	

Tableau 34 : Propriétés chromatographiques et chromogéniques des composés extraits de la fraction "Esters phénoliques solubles" de la moutarde au cours de l'oxydation sous oxygène (100 bars), à 50°C.

Séparation par chromatographie sur papier Whatmann n°1
Solvant : Isopropanol/Ammoniaque/Eau (8 : 1 : 1 ; v/v/v). Révélateur U.V./P.A.N.

	Produit n° (Fig.73)	Rf	U.V.	UV + NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	2	0,26	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	
	4	0,56	/	/	Ro-Og	Gris-Vi	
	5	0,63	Vert (Ve)	Vert	/	/	
	6	0,76	Jaune-Ve	Vert	Rouille	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 1 jour	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	2	0,25	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Jaune-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Brun-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 2 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	3	0,45	/	/	Orange	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 4 jours	1	0,21	Violet	Bleu-violet	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	3	0,48	/	/	Orange	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 7 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Rose-Vi	Gris-vert	Ac sinapique
	3	0,46	/	/	Jaune-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,55	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	/	/	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	

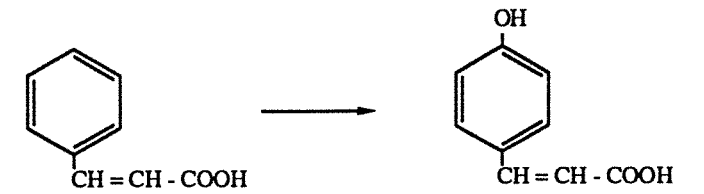
Tableau 35 : Caractéristiques chromatographiques de la fraction "Esters phénoliques solubles" extraites de moutarde non sulfitée, oxydée sous pression d'oxygène (100 bars) à 50°C.

Séparation sur couche mince de Cellulose MN 300.
Solvant d'élution : Acide acétique 2% (v/v)

à la transformation du complexe Fe^{2+}-O_2, d'abord en anion superoxyde (O_2^-) puis en radical hydroxyle OH°.

L'hydroxylation peut également être de nature enzymatique, liée à la présence, dans la pâte de moutarde, d'une activité peroxydasique importante.

Dans le cas de l'acide paracoumarique, le précurseur de l'hydroxylation devrait être l'acide cinnamique :



Acide cinnamique — Acide paracoumarique

Cependant, il est peu probable que l'hydroxylation du cycle benzénique soit sélective au point d'entraîner la formation d'un seul produit, à moins que la réaction ne soit de nature enzymatique. Le deuxième composé observé, de mêmes caractéristiques chromogéniques (P.A.N.) que l'acide para-coumarique supposé est peut-être l'acide ortho-coumarique, ou, plus probablement en raison de l'encombrement stérique, l'acide méta-coumarique. Cette hypothèse ne nous permet cependant pas de connaître la vraie nature du mécanisme d'hydroxylation : chimique ou enzymatique.

On peut remarquer que la littérature ne fait pas état de la présence d'acide cinnamique dans la moutarde, ni dans les graines du genre *Brassica* en général. L'acide formé n'est peut-être pas en réalité l'acide p-coumarique, le processus oxydatif observé pourrait entraîner la coupure d'un certain nombre de doubles liaisons portées par les chaînes en C3, avec formation de groupements aldéhydiques et acides.

L'induction par l'oxygène d'un processus radicalaire peut entraîner la polycondensation des entités radicalaires phénoliques entre elles. Les produits de la réaction sont généralement colorés en brun si le degré de polymérisation est suffisamment élevé.

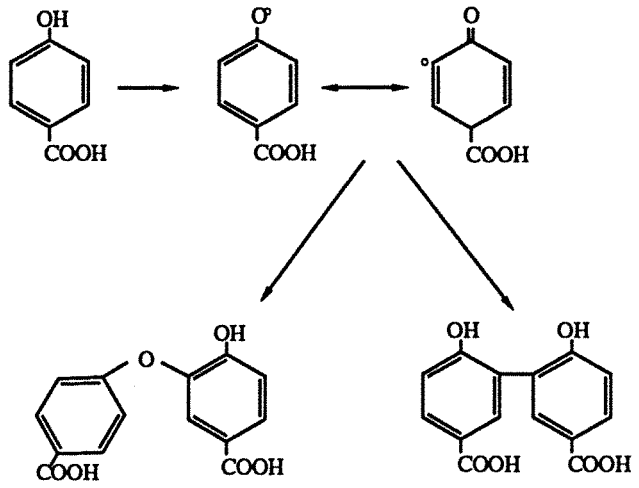


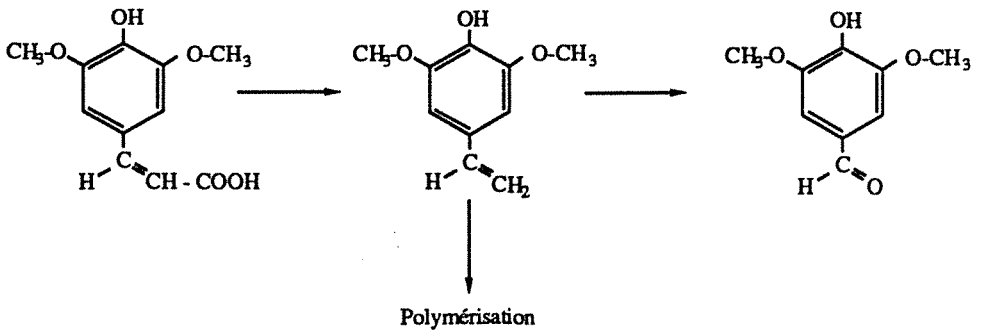
Figure 74 : Mécanisme de polycondensation radicalaire des phénols.

Les acides phénols peuvent également être le siège de décarboxylations. Les vinylphénols ainsi formés sont souvent à l'origine de défauts de flaveur (LEE et NAGY, 1990, b ; NAIM & coll., 1988 ; PYYSALO & coll., 1977). Cette réaction a particulièrement été observée par NAIM & coll. (1988) dans le cas de l'acide férulique. Ces auteurs ont démontré que l'acide férulique était le précurseur du paravinylgaïacol, responsable de faux-goûts dans le jus d'orange entreposé, et lui même susceptible d'être oxydé en vanilline. La transformation de l'acide p-coumarique en vinylphénol est surtout importante lors d'un traitement thermique ; ce type de réaction pourrait se développer dans une moutarde maintenue à 50° C.

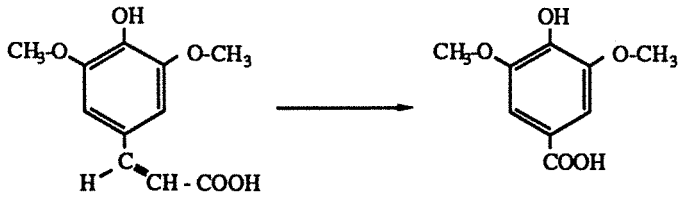
Cette réaction de décarboxylation nécessite également la présence d'acide férulique à l'état libre, or, les acides phénols sont essentiellement présents sous forme d'ester. Il convient de noter qu'à chaud et en milieu acétique, des réactions d'hydrolyse peuvent intéresser à la fois les fractions esters solubles et insolubles. La présence d'une activité de nature estérasique : la sinapine estérase (EC 3.1.1.49) contribue également à la libération d'acide sinapique dans le milieu réactionnel.

Si la décarboxylation des acides phénols de la série cinnamique est un processus courant, la présence d'acide sinapique en quantité notable devrait conduire préférentiellement

à la synthèse de p.vinylsyringol, puis de syringaldéhyde, en remarquant que l'aptitude à la polymérisation des dérivés vinyliques est élevée .



L'oxydation de la chaîne latérale des acides hydroxycinnamiques, selon un mécanisme comparable à la β-oxydation, est également possible. La réaction se traduit par l'apparition de l'acide hydroxybenzoïque correspondant. Dans le cas de l'acide sinapique, c'est l'acide syringique qui devrait être formé :



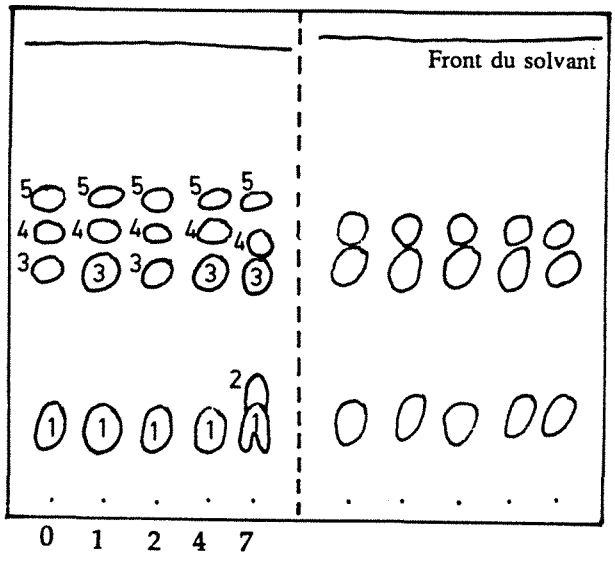
Dans une moindre mesure, cette voie d'oxydation peut conduire à la formation d'acide vanillique à partir de l'acide férulique. La réaction intéresse aussi les esters d'acides phénols et d'alcools : les esters des acides sinapique, caféique, para-coumarique et férulique.

A 50° C, la cinétique de formation du produit d'oxydation (Ar-X) est accélérée : le composé violet apparaît au bout d'un jour, au lieu de deux à 20° C. En revanche, la quantité de produit formé est moindre à 50°C qu'à 20°C, ce qui pourrait justifier la manifestation simultanément d'un processus de polycondensation ou de dénaturation, en milieu oxydant, de l'activité peroxydasique. De plus, la formation du composé Ar-X est absente d'un milieu réactionnel maintenu à 50°C, sous azote.

	Produit n° (Fig.75)	Rf	U.V.	UV + NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,17	Bleu	Bleu	Orange	Gris/Vert	Ac. sinapique
	3	0,50	Bleu	Bleu	Rose-orange	Bleu	
	4	0,59	Bleu	Bleu	Beige-rosé	Bleu	
	5	0,66	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde après 1 jour	1	0,17	Bleu	Bleu	Orange	Gris/Vert	Ac. sinapique
	3	0,50	Bleu	Bleu	Rose-orange	Bleu	
	4	0,59	Bleu	Bleu	Beige-rosé	Bleu	
	5	0,66	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde après 2 jours	1	0,16	Bleu	Bleu	Orange	Gris/Vert	Ac. sinapique
	3	0,50	Bleu	Bleu	Rose-orange	Bleu	
	4	0,58	Bleu	Bleu	Beige-rosé	Bleu	
	5	0,66	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde après 4 jours	1	0,17	Bleu	Bleu	Orange	Gris/Vert	Ac. sinapique
	3	0,50	Bleu	Bleu	Rose-orange	Bleu	
	4	0,58	Bleu	Bleu	Beige-rosé	Bleu	
	5	0,66	Bleu	Bleu	/	/	
Moutarde après 7 jours	1	0,17	Bleu	Bleu	Orange	Gris/Vert	Ac. sinapique
	2	0,24	Violet	Bleu	/	/	
	3	0,49	Bleu	Bleu	Rose-orange	Bleu	
	4	0,57	Bleu-Vi	Bleu	Beige-rosé	Bleu	
	5	0,66	Bleu	Bleu	/	/	

Tableau 36 : Caractéristiques chromatographiques de la fraction "Composés Phénols Libres" extraites de la moutarde non sulfitée maintenue sous azote, à 50°C.

Séparation sur couche mince de cellulose MN 300, avec le solvant Acide acétique à 2% (v/v).

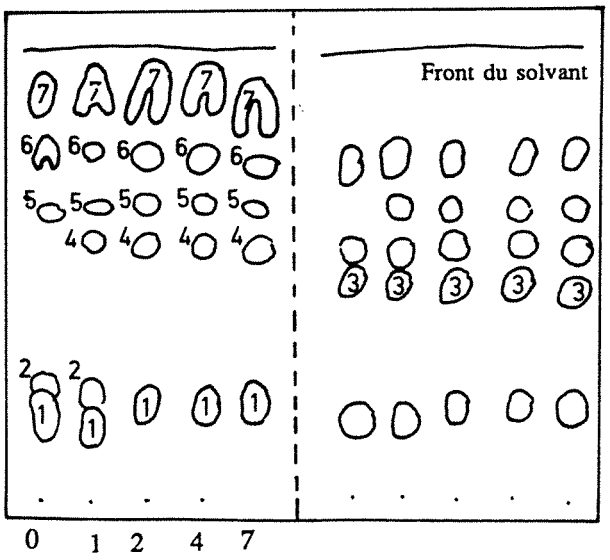


Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques libres" extraite de la moutarde
Moutarde maintenue sous azote, à 20°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 75 : Séparations chromatographiques des extraits (éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v)) d'une moutarde non sulfitée maintenue sous azote, à 50°C.

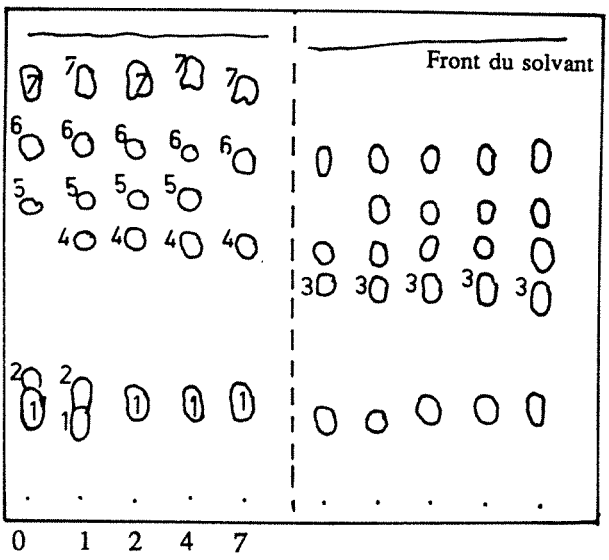
Extraits par le mélange Ether-Acétate d'éthyle (1:1, v/v).



Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques solubles" extraite de la moutarde
Moutarde maintenue sous azote, à 20°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 76 : Séparations chromatographiques de la fraction "Esters phénoliques solubles" contenus dans une moutarde non sulfitée maintenue sous azote et à 20°C.



Chromatographie sur couche mince de cellulose (Cellulose MN 300) de la fraction "Composés phénoliques solubles" extraite de la moutarde
Moutarde maintenue sous azote, à 50°C, pendant 7 jours.

Solvant : Acide acétique 2% (v/v)
Révélation : - U.V. + NH_3
- Réactif à la P.A.N.

Figure 77 : Séparations chromatographiques de la fraction "Composés Phénoliques Solubles" contenus dans une moutarde non sulfitée maintenue sous azote et à 50°C.

Extraits (éther éthylique-acétate d'éthyle (1:1, v/v))

1.3. Moutarde maintenue sous azote

1.3.1. Phénols libres.

Comme pour la moutarde oxydée sous pression d'oxygène (100 bars), les acides phénols identifiés dans la fraction " Composés phénoliques libres" ne sont pas modifiés même après maintien pendant 7 à 15 jours sous azote du milieu réactionnel à 20 ou à 50°C.

Cette observation montre bien le rôle décisif de l'oxydation dans ce processus.

	Produit n° (Fig.76)	Rf	U.V.	UV + NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	2	0,26	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	/	/	Ro-Og	Gris-Vi	
	5	0,63	Vert (Ve)	Vert	/	/	
	6	0,76	Jaune-Ve	Vert	Rouille	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 1 jour	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	2	0,25	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Brun-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 2 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	3	0,45	/	/	Orange	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 4 jours	1	0,21	Violet	Bleu-violet	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	3	0,48	/	/	Orange	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 7 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Rose-Vi	Gris-vert	Ac sinapique
	3	0,46	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,55	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	/	/	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	

Tableau 37 : Caractéristiques chromatographiques de la fraction "Esters phénoliques solubles" extraites de moutarde non sulfitée, maintenue sous azote, à 20°C.

Séparation sur couche mince de Cellulose MN 300.
Solvant d'élution : Acide acétique 2% (v/v)

1.3.2. Esters phénoliques solubles.

Les composés phénoliques issus des combinaisons solubles ne semblent pas non plus modifiés, même à 50° C. Ce résultat est à rapprocher de l'aspect de la moutarde au cours de l'expérience. En effet, la pâte ne présente pas de signe visible de brunissement, même après maintien durant 15 jours sous azote à 50°C.

	Produit n° (Fig.77)	Rf	U.V.	UV+NH_3	P.A.N.	PAN/ Na_2CO_3	Identification
Moutarde fraîche	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	2	0,26	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Jaune-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	/	/	Ro-Og	Gris-Vi	
	5	0,63	Vert (Ve)	Vert	/	/	
	6	0,76	Jaune-Ve	Vert	Rouille	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 1 jour	1	0,18	Bleu	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	2	0,25	Violet	Violet	/	/	
	3	0,48	/	/	Jaune-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Brun-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 2 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	3	0,45	/	/	Jaune-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 4 jours	1	0,21	Violet	Bleu-violet	Orange	Gris-Ve	Ac sinapique
	3	0,48	/	/	Orange	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,56	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	Vert	Vert	Orange	Rose	
	6	0,76	Jaune	Vert	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,92	Jaune	Jaune	/	/	
Moutarde oxydée pendant 7 jours	1	0,21	Violet	Bleu	Rose-Vi	Gris-vert	Ac sinapique
	3	0,46	/	/	Rose-Og	Rose-Vi	Ac pOH benz
	4	0,55	Violet	Violet	Rose-Og	Gris-Vi	
	5	0,65	/	/	Orange	Rose	
	6	0,75	Tache sombre	Tache sombre	Beige-Ro	Bleu	
	7	0,90	Jaune	Jaune	/	/	

Tableau 38 : Caractéristiques chromatographiques de la fraction "Esters phénoliques solubles" extraites de moutarde non sulfitée, maintenue sous azote, à 50°C.

Séparation sur couche mince de Cellulose MN 300.
Solvant d'élution : Acide acétique 2% (v/v)

1.4. Conclusion.

Les résultats montrent que l'oxygène est fortement impliqué dans l'oxydation des phénols de la fraction esters solubles de la pâte de moutarde. Toutefois, il est difficile pour le moment de privilégier un mécanisme oxydasique plutôt qu'oxydatique, faute de n'avoir pas pu identifier le composé révélé en violet par la P.A.N.

Néanmoins, certaines observations, notamment la formation en quantité plus abondante, à température ambiante (20°C), du composé révélé en violet tendent à conforter l'hypothèse d'une origine oxydasique pour ce dernier, ce qui permet de privilégier le rôle dominant de la POD dans le processus d'hydroxylation.

Cette interprétation n'est cependant pas la seule dans la mesure où l'hydroxylation peut être aussi d'origine oxydatique et liée à l'activité du fer ferreux (cf. réaction de Fenton).

Il convient d'ajouter encore que l'absence de formation de produit révélé en violet à la P.A.N. et de pigments bruns dans la moutarde maintenue sous azote à 50°C constitue un argument de taille pour confirmer l'origine oxydative et la participation de certains composés phénoliques au brunissement de la moutarde. Cette observation n'exclut cependant pas la participation d'autres constituants de nature différente à ce processus, en particulier les produits des réactions de Maillard.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à approfondir les potentialités d'hydroxylation de la moutarde à l'égard de substrats aromatiques modèles tels que l'aniline.

2. Mise en évidence du processus d'hydroxylation.

Il nous a paru intéressant de mettre en évidence la manifestation de processus d'hydroxylation des composés aromatiques de la moutarde, au cours de l'autooxydation. Pour cela, nous avons fait le choix d'un substrat exogène, facilement identifiable dans ce milieu.

Une moutarde non sulfitée a été enrichie en aniline à raison de 60 µmol/g de moutarde et oxydée à 20 et 50°C, sous forte pression en oxygène (100 bars), dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude de l'autooxydation de la moutarde.

2.1. Autooxydation de la moutarde à 20°C.

Dans ces conditions, l'oxydation à 20°C, pendant 24 heures, conduit à la formation des dérivés ortho-, para-, et méta-aminophénols. Toutefois, la présence de nitrobenzène, même en faible quantité, n'a pas pu être mise en évidence (Figure 78 b).

L'hydroxylation entraîne la formation de produits différents. En milieu acide, l'aniline est facilement oxydée en phénol-hydroxylamine ; les transformations ultérieures conduisent à la formation de para-aminophénol ou à celle de produits de condensation des phénolhydroxylamines, composés colorés en brun-noir selon leur degré de polymérisation.

A cette oxydation chimique directe peut se superposer une hydroxylation liée à la présence dans le milieu de peroxyde d'hydrogène. En présence de cations métalliques tels que Fe^{2+}, le radical OH° est formé.

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH^{\circ} + OH^{-}$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\circ} + OH^{-} \text{ (1)}$$

(1) Selon la réaction de Fenton décrite précedemment.

Le radical OH° est électrophile, les composés aromatiques substitués par des groupements donneurs tels que -NH2, réagissent plus vite et conduisent surtout à des dérivés hydroxylés en position ortho ou para. Le caractère radicalaire de la réaction se traduit toutefois par l'apparition de produits substitués en ortho, para et méta en même temps que de produits de couplage.

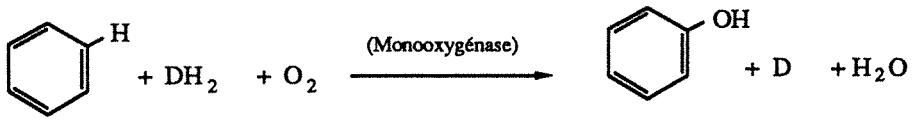
La même réaction se déroule en présence d'oxygène moléculaire :

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{2+}\text{-}O_2 \longrightarrow Fe^{3+}\text{-}O_2^{-\circ} \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^{-}$$
$$2O_2^{-} + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène formé réagit, dans les mêmes conditions avec formation de radicaux OH°.

Une fois encore, il est important de souligner le rôle des réducteurs tels que l'ion ascorbate dans la régénération des ions Fe^{2+}, ce qui entraîne la formation accrue de radicaux OH°.

L'hydroxylation peut aussi être de nature enzymatique. Les monooxygénases utilisent l'oxygène moléculaire. La réaction fait intervenir, selon un mécanisme semblable au mécanisme chimique, un atome métallique qui occupe le site actif de l'enzyme.



Le mécanisme a été décrit dans le cas de la tyrosinase par TOUSSAINT et LERCH (1987). L'hydroxylation s'effectue en ortho, une déshydrogénation ultérieure conduit à l'ortho-aminoquinone correspondante.

Les peroxydases, en présence d'oxygène moléculaire et d'un donneur d'hydrogène tel que l'acide dihydrofumarique (KLIBANOV et coll., 1981) peuvent également manifester une activité d'hydroxylation.

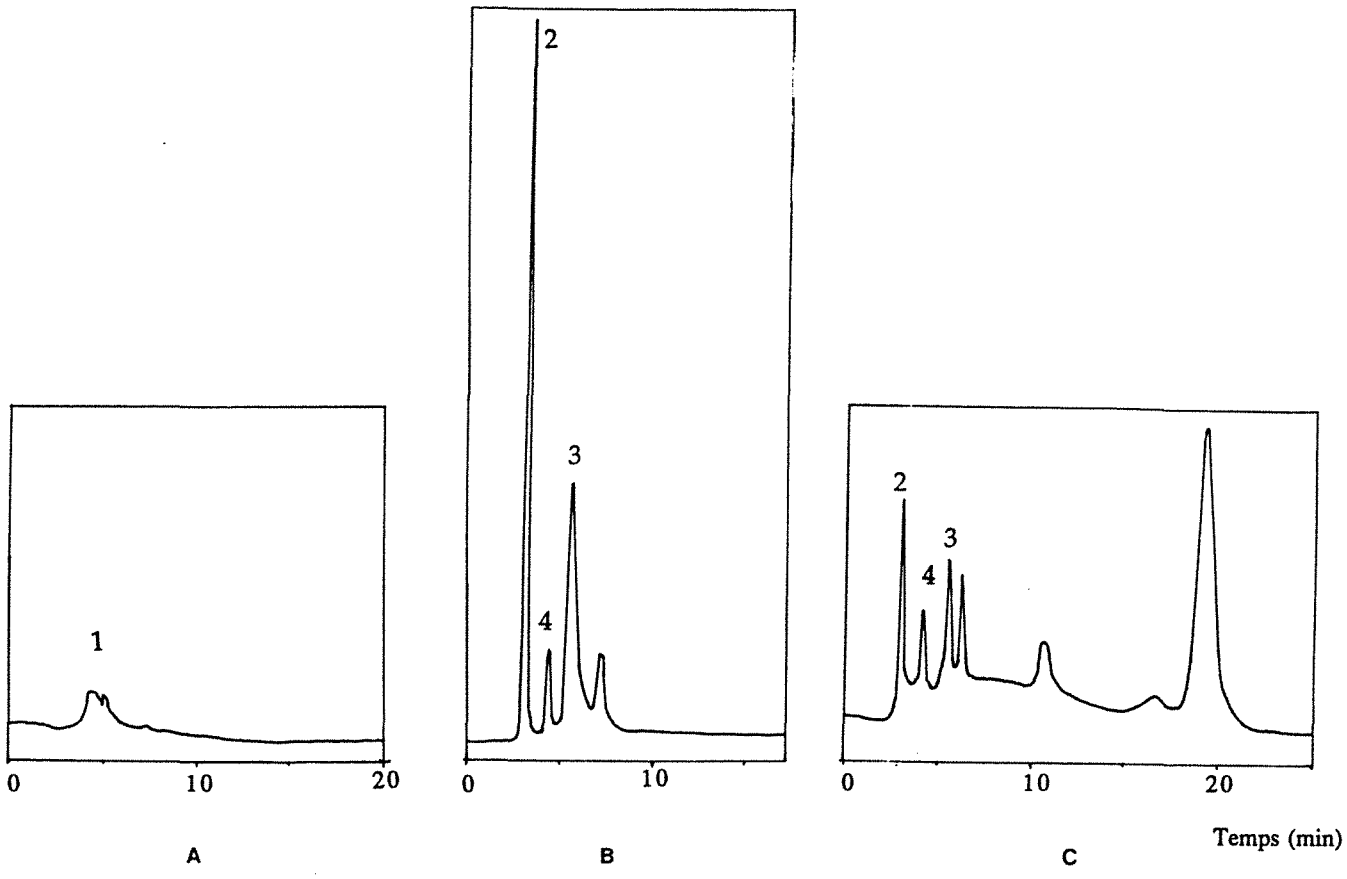
Dans la moutarde, l'hydroxylation de l'aniline se traduit par la formation des aminophénols isomères, le composé méta étant formé en quantité non négligeable (Figure 78).

Isomère	Quantité (µg/g moutarde)
Ortho-aminophénol	0,3
Méta-aminophénol	6,1
Para-aminophénol	0,5

Tableau 39 : Répartition des aminophénols formés au cours de l'oxydation à 20°C et sous pression d'oxygène (100 bars) de la moutarde non sulfitée, enrichie en aniline.

Le processus d'hydroxylation mis en évidence peut être de nature chimique ou enzymatique ; les réactions mises en oeuvre peuvent être catalysées soit par des cations de métaux lourds (Cu^{+}, Fe^{2+}) soit par la peroxydase de la moutarde.

Toutefois, la proportion importante de méta-aminophénol constitue un argument en faveur du mécanisme peroxydasique.



1. Aniline
2. Para-aminophénol
3. Ortho-aminophénol
4. Méta-aminophénol

Figure 78 : Fractionnement par chromatographie HPLC des produits d'hydroxylation de l'aniline, dans une moutarde autooxydée sous pression d'oxygène (100 bars).

A. Moutarde fraîche.
B. Moutarde autooxydée pendant 24 heures à 20°C.
C. Moutarde autooxydée pendant 24 heures à 50°C.

Séparation sur colonne C18.
Solvant d'élution : Tris-acétate (0,2 mol/l ; pH 8) contenant 0,75% (v/v) de triéthylamine. Débit : 1.5 ml/min.
Détection électrochimique à + 0,65V.

2.2 Autooxydation de la moutarde à 50°C.

A 50°C, la réaction conduit également aux 3 isomères, sans formation de nitrobenzène, cependant que la proportion des dérivés ortho- et para-hydroxylés diminue. Des pics nouveaux apparaissent qui pourraient correspondre soit à un dérivé nitroso, soit à un produit de couplage de l'hydroxylamine, à moins qu'il ne s'agisse de l'oxydation des ortho- et para-aminophénols en aminoquinones.

Il y a lieu cependant de remarquer que la quantité de produits formés est moins importante qu'à 20°C. On peut donc envisager une condensation accrue, notamment du para-aminophénol. La proportion de dérivé méta, pourtant thermodynamiquement la moins favorisée demeure inchangée.

Isomère	Quantité (µg/ g moutarde)
Ortho-aminophénol	0,15
Méta-aminophénol	6,1
Para-aminophénol	0,15

Tableau 40 : Répartition des aminophénols formés au cours de l'oxydation à 50°C et sous pression d'oxygène (100 bars) de la moutarde non sulfitée, enrichie en aniline.

La réaction est exothermique, une augmentation de la température devrait se traduire par une augmentation de la vitesse. D'autre part, la peroxydase étant thermorésistante, il y a tout lieu de penser qu'elle sera active à 50°C. On peut donc supposer que l'hydroxylation du noyau aromatique est en grande partie d'origine enzymatique.

La mise en évidence de l'hydroxylation de substrats aromatiques modèles tels que l'aniline nous a conduit à étudier les modifications subies par les composés phénoliques de la moutarde.

3. Recherche de l'hydroxylation des composés phénoliques.

La même réaction, appliquée aux phénols conduit à la formation de composés diphénoliques tels que les ortho-diphénols. Selon JOB et DUNFORD (1976), cette réaction est d'autant plus probable qu'avec la peroxydase de raifort, ces auteurs ont observé une vitesse d'hydroxylation multipliée par 100 lorsqu'on utilise des phénols comme substrats au lieu de

l'aniline. L'affinité de l'enzyme pour ces substrats est nettement plus élevée que pour l'aniline. La réaction s'effectuerait selon un mécanisme radicalaire incluant l'enzyme.

La formation des diphénols peut conduire ensuite à la formation de quinones qui se polycondenseront en produits bruns.

L'analyse, par CPG, des phénols contenus dans les différentes fractions : phénols libres, esters solubles, esters insolubles, d'une moutarde autooxydée, à 20 ou à 50°C, en présence ou non de SO_2 devrait permettre la mise en évidence de cette réaction.

Nous avons pu confirmer à la fois les résultats obtenus par chromatographie sur couches minces ainsi que ceux obtenus par ROSTEIN (1982) : la fraction esters insolubles ne contient pas de phénols en quantités détectables. L'oxydation ne modifie pas cette composition.

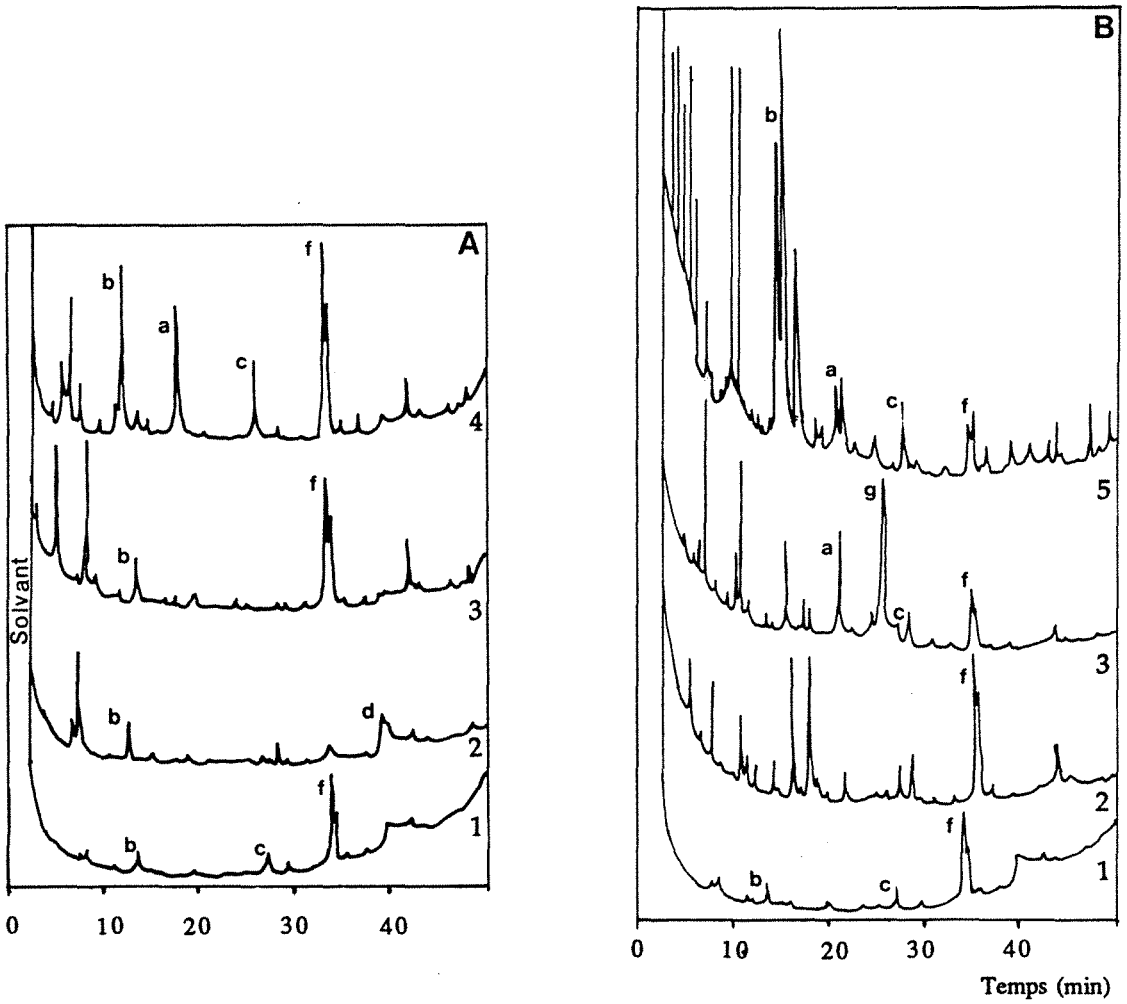
L'analyse de la fraction esters solubles nous a permis de mettre en évidence la présence d'acide sinapique en quantité dominante, d'acide férulique ainsi que des quantités plus faibles d'acide para-hydroxybenzoïque, d'acide para-coumarique et d'acide vanillique.

Les modifications apportées à la composition chimique des fractions sont difficiles à mettre en évidence, toutefois, il semble que les fractions phénols neutres, esters solubles voient leurs compositions varier au cours de l'oxydation (Figure 79).

Le processus oxydatif pourrait entraîner la formation de phénols à partir des acides cinnamiques, après oxydation et élimination de la chaîne latérale.

L'oxydation des acides féruliques et sinapique pourrait aboutir à la formation du 2-méthoxyphénol, du 2,6-diméthoxyphénol ainsi que du gaïacol et du syringaldéhyde.

La chaîne latérale peut être éliminée avec formation d'acide ou d'aldéhyde benzoïque (acide syringique ou syringaldéhyde dans le cas de l'acide sinapique).



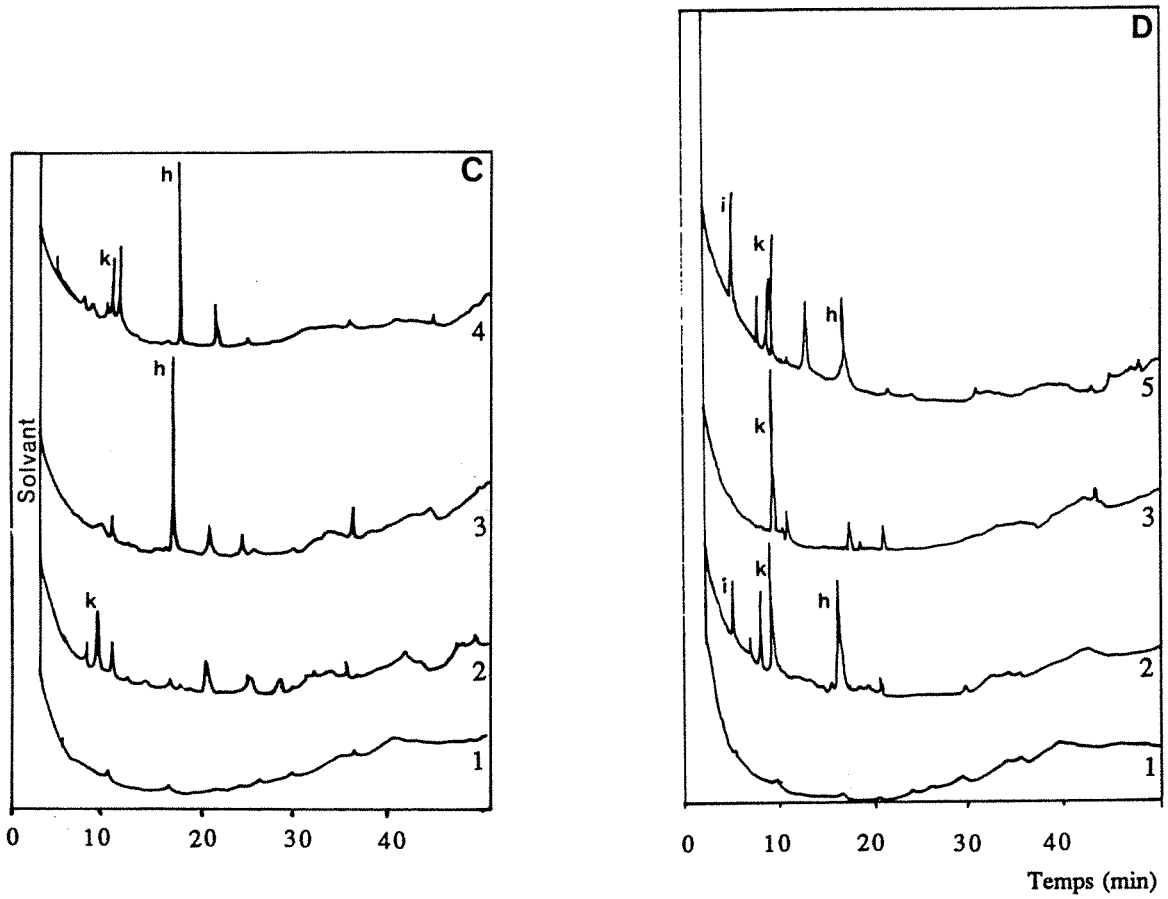
a- Acide vanillique
b- Acide parahydroxybenzoique
c- Acide paracoumarique
d- Acide sinapique
e- Acide caféique
f- Acide férulique
g- Acide syringique

Figure 79 a : Séparation chromatographique des fractions "Acides phénols libres" d'une moutarde auto-oxydée.

A. Autooxydation à 20°C d'une moutarde fraîche
B. Autooxydation à 50°C d'une moutarde fraîche

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours
5. Moutarde oxydée pendant 15 jours

Séparation sur colonne capillaire OV1. Température initiale : 120°C, température finale : 260°C, Gradient : 4°C/min.

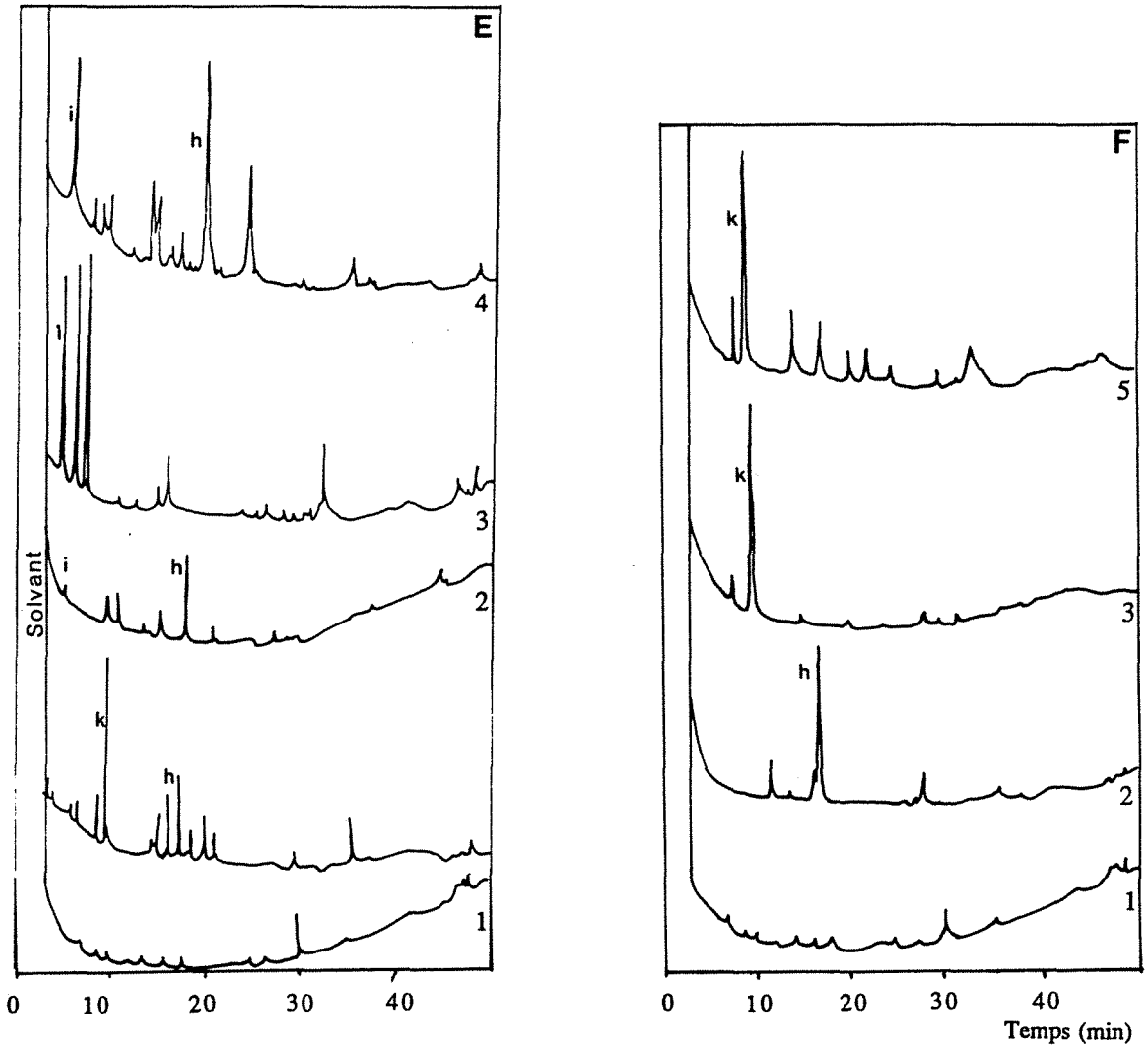


1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours
5. Moutarde oxydée pendant 15 jours

h- Syringaldéhyde
i- 2,6 diméthoxyphénol
k- Vanilline

Figure 79 b : Séparation chromatographique des fractions "Phénols neutres libres" d'une moutarde auto-oxydée.

C. Autooxydation à 20°C d'une moutarde fraîche
D. Autooxydation à 50°C d'une moutarde fraîche

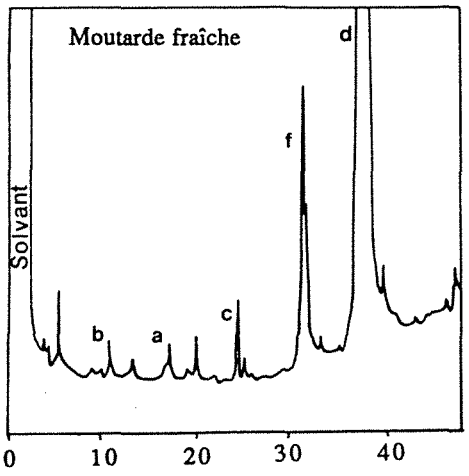


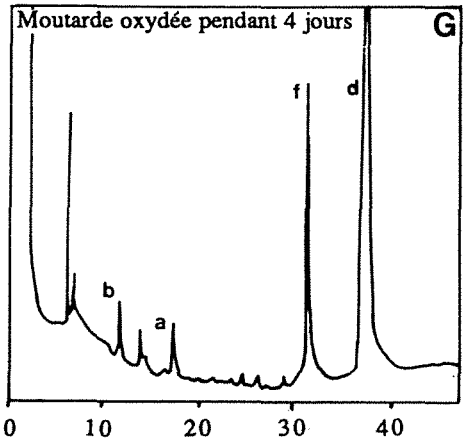
1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours
5. Moutarde oxydée pendant 15 jours

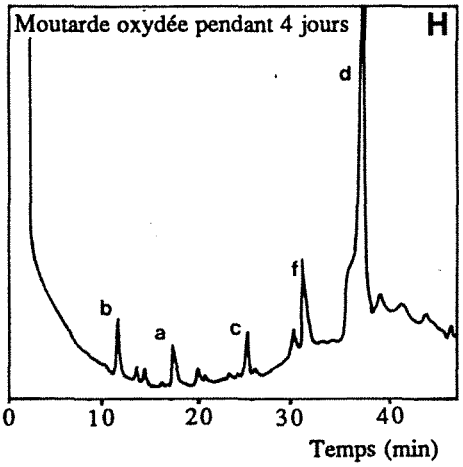
h- Syringaldéhyde
i- 2,6 diméthoxyphénol
k- Vanilline

Figure 79 c : Séparation chromatographique des fractions "Phénols neutres engagés dans des combinaisons esters solubles" d'une moutarde auto-oxydée.

E. Autooxydation à 20°C d'une moutarde fraîche
F. Autooxydation à 50°C d'une moutarde fraîche







a- Acide vanillique
b- Acide parahydroxybenzoique
c- Acide paracoumarique
d- Acide sinapique
e- Acide caféique
f- Acide férulique
g- Acide syringique

Figure 79 d : Séparation chromatographique des fractions "Acides phénols engagés dans des combinaisons esters solubles" d'une moutarde auto-oxydée.

G. Autooxydation à 20°C d'une moutarde fraîche
H. Autooxydation à 50°C d'une moutarde fraîche

Séparation sur colonne capillaire OV1. Température initiale : 120°C, température finale : 260°C, Gradient : 4°C/min.

Il est toutefois peu probable que le groupement acyle des esters solubles puisse être l'objet d'une oxydation, sous peine de voir le produit de dégradation résultant extrait dans la fraction "Phénols libres".

L'hydroxylation, au contraire, semble tout à fait possible dans la mesure où elle a été mise en évidence précédemment sur l'aniline.

Toutefois, l'hydroxylation semble peu probable dans le cas de l'acide sinapique en raison de sa substitution. C'est l'acide férulique qui présente apparemment le plus de chance d'être hydroxylé dans cette fraction.

Par ailleurs, il est intéressant d'observer, dans les fractions "Phénols libres", un accroissement de la teneur en syringaldéhyde au bout de 4 à 7 jours d'oxydation à 20°C (Figure 79). Ce processus semble étroitement lié à l'oxydation de la chaîne en C_3 de l'acide sinapique.

La moutarde a également été enrichie en sulfite (50 ppm) puis auto-oxydée dans les mêmes conditions de températures, sous pression d'oxygène, les résultats correspondants sont regroupés en annexe.

Des modifications dans les différentes fractions ont également été mise en évidence par chromatographie HPLC couplée à une détection électrochimique. Les résultats correspondants sont regroupés en annexe.

4. Conclusion.

Cette étude a permis de mettre en évidence la formation, dans le milieu réactionnel, de produits d'oxydation.

Il convient une fois encore de noter l'importance de l'oxygène dans la formation des produits de la réaction. En effet, l'oxydation de la moutarde sous pression d'oxygène (100 bars) conduit à la formation de produits d'oxydation des phénols, et particulièrement à celle du composé Ar-X, révélé en bleu-violet à la P.AN. Ce composé n'a, en revanche, pas été révélé dans la moutarde maintenue sous azote.

La température est également un facteur important qui modifie la cinétique du processus d'oxydation des composés phénoliques. En effet, les aminophénols issus de l'hydroxylation de l'aniline ainsi que le composé Ar-X sont formés en quantités moins importantes à 50°C qu'à 20°C.

Nous avons pu montrer que les mécanismes d'oxydation mis en jeu, dans ces conditions, font intervenir vraisemblablement à la fois une hydroxylation, sans doute de nature oxydasique, et une dégradation de la chaîne en C3 des acides cinnamiques, selon un mécanisme que nous n'avons pas encore élucidé.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à étudier le développement des réactions de brunissement non enzymatique à partir des constituants glucidiques.

IV. ETUDE DU BRUNISSEMENT NON ENZYMATIQUE

Les réactions de condensation entre oses réducteurs et composés aminés, entraînent la formation de dérivés d'Amadori, qui, par condensation, conduisent à la formation de réductones, de mélanoïdines et de pigments bruns.

Afin d'apprécier le brunissement de la moutarde, nous avons suivi par spectrophotométrie la cinétique de formation des pigments bruns entre 200 et 700 nm. Le processus a été suivi dans la pâte de moutarde, en présence et en l'absence d'oxygène.

1. Etude des pigments solubles dans l'eau

Les pigments solubles dans l'eau sont étudiés à partir d'une suspension de moutarde à 20% (p/v) dans le tampon acétate soumise à une extraction par l'éther éthylique afin d'éliminer les composés phénoliques (cf. Matériel et Méthodes).

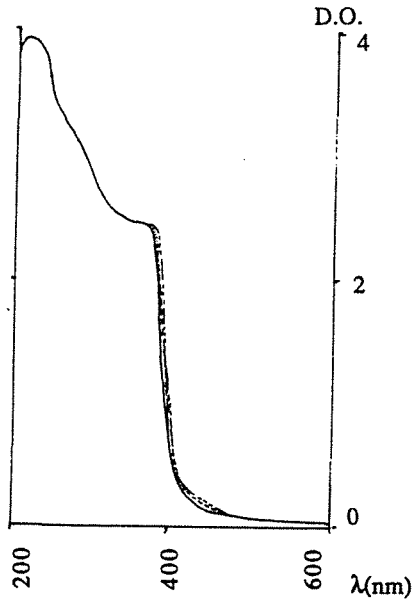
La moutarde oxydée à 50° C sous pression d'oxygène (100 bars), pendant 7 jours présente un accroissement très significatif de la teneur en composés absorbants entre 400 et 500 nm. Les produits formés sont des produits bruns (Figure 80).

Des essais préliminaires effectués comparativement en présence d'air comprimé (pression 0,5 bars) et à 50° C ont montré que l'accroissement de la D.O. devenait important après 30 à 75 jours d'autooxydation (Figure 81).

En revanche, la moutarde maintenue à 50° C, sous azote, pendant 7 jours, ne donne pas lieu à une modification sensible du spectre d'absorption. Ceci est en accord avec les observations faites directement sur des pots de moutarde maintenus à 50° C et sous azote. Les produits bruns sont pratiquement inexistants, la coloration de la moutarde n'est pas modifiée même au bout de 7 jours (Figure 82).

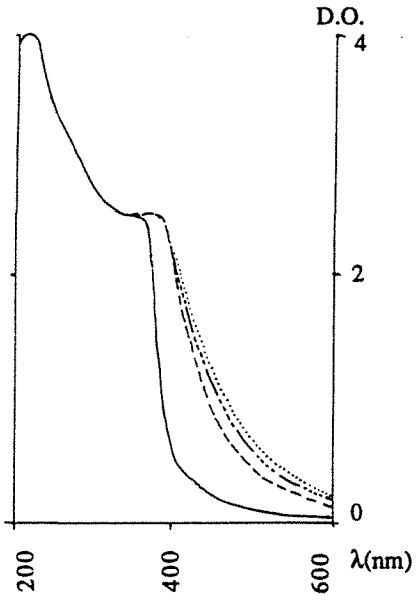
Le spectre d'absorption des composés solubles dans l'eau d'une moutarde oxydée à 20° C, sous oxygène (100 bars), pendant 7 jours, n'est pas modifié (Figure 83).

Ces résultats montrent que le brunissement non enzymatique, qui n'est pas mis en évidence à 20°C au bout de 7 jours, devient significatif à 50°C, en présence d'oxygène.



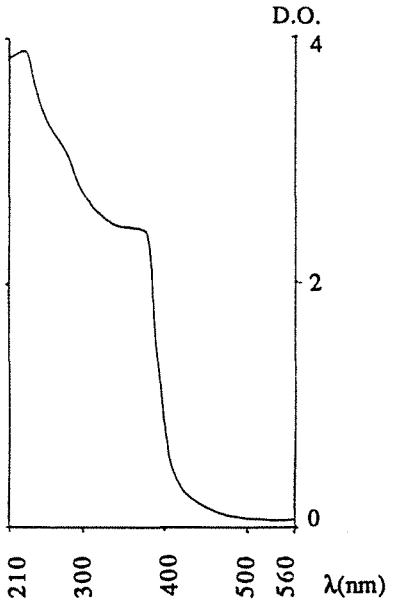
1. Moutarde fraîche ——————
2. Moutarde oxydée pendant 1 jour. .....
3. Moutarde oxydée pendant 2 jours. - - - - - -
4. Moutarde oxydée pendant 4 jours. —— - - -
5. Moutarde oxydée pendant 7 jours. __ . __

Figure 80 :Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits dans la phase aqueuse, après élimination des phénols par l'éther éthylique. Moutarde autooxydée sous pression d'oxygène (100 bars) à 50°C.



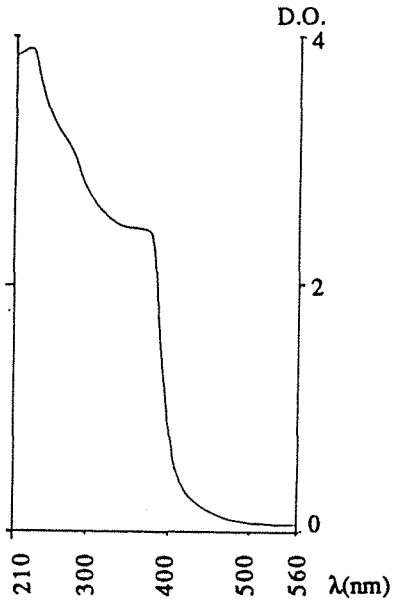
1. Moutarde fraîche ——
2. Moutarde oxydée pendant 15 jours. — — —
3. Moutarde oxydée pendant 30 jours. —— - - - -
4. Moutarde oxydée pendant 60 jours. .....

Figure 81 :Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits dans la phase aqueuse, après élimination des phénols par l'éther éthylique. Moutarde autooxydée sous pression d'air (0,5 bars) à 50°C.



1. Moutarde fraîche
2. Moutarde maintenuel jour sous azote.
3. Moutarde maintenue 2 jours sous azote.
4. Moutarde maintenue 4 jours sous azote.
5. Moutarde maintenue7 jours sous azote.

Figure 82 :Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits dans la phase aqueuse, après élimination des phénols par l'éther éthylique. Moutarde maintenue sous azote à 50°C.



1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 1 jour.
3. Moutarde oxydée pendant 2 jours.
4. Moutarde oxydée pendant 4 jours.
5. Moutarde oxydée pendant 7 jours.

Figure 83 :Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits dans la phase aqueuse, après élimination des phénols par l'éther éthylique. Moutarde autooxydée sous pression d'oxygène (100 bars) à 20°C.

Une séparation simplifiée des pigments solubles formés à 50°C, après 75 jours d'oxydation sous air comprimé a été tentée, pour en préciser la nature.

Le surnageant après centrifugation d'un extrait de moutarde oxydée, à 20% dans le tampon acétate est utilisé. Les pigments de poids moléculaire supérieur à 10 000 sont retenus par ultrafiltration sur membrane AMICON PM 10. Une partie des produits bruns obtenus sont retenus par passage sur une cartouche garnie de phase inverse C18 (cartouche Sep-Pack C18). Les élutions successives ont permis de séparer 4 groupes de produits :

- des composés jaunes, élués par le méthanol,
- des composés légèrement bruns, qui passent dans la fraction NaOH 0,75 M
- des pigments bruns obtenus après élution par le mélange Acétone/Eau (1:1, v/v)
- des composés jaune pâle, élués dans la fraction Méthanol/HCl (HCl qsp pH2)

Cette tentative de séparation sommaire a le mérite de mettre en évidence la diversité des produits bruns formés au cours de l'autooxydation de la moutarde, comme en témoignent les spectres U.V.-Visible des différentes fractions présentées Figure 84.

2. Etude de la formation des dérivés du furfural

Au cours des réactions entre oses réducteurs et composés aminés (réactions de Maillard), l'hydroxyméthylfurfural et le furfural font partie des produits intermédiaires des réactions de brunissement développées au cours de la conservation ou des traitements thermiques des produits alimentaires.

L'HMF est formé à partir des hexoses, au cours du processus de traitement thermique. Eminemment réactif, il peut initier des réactions de brunissement par polymérisation et réarrangements, intervenant en présence ou en l'absence d'oxygène.

Des études récentes (LEE et NAGY ; 1990, a), effectuées sur des systèmes modèles à pH 3,5, voisin de celui de la moutarde, ont montré que le fructose est particulièrement efficace dans la formation de l'hydroxyméthylfurfural. La présence d'acides organiques, la composition minérale et la nature des acides aminés contenus dans le milieu tendent à modifier la cinétique de formation de l'HMF.

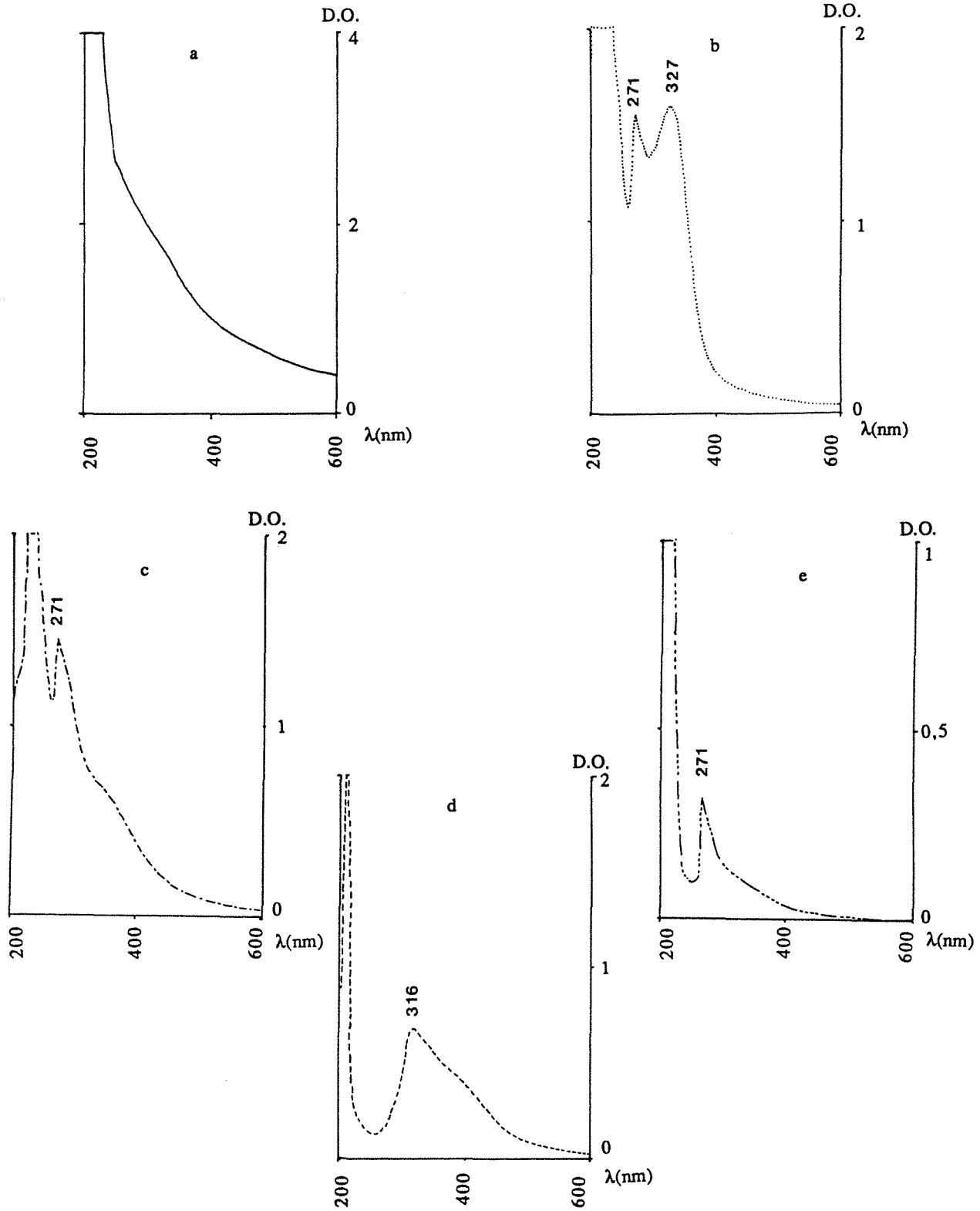


Figure 85 : Spectres UV-Visible des fractions séparées sur cartouche Sep-Pack C18 à partir d'un extrait aqueux de moutarde oxydée sous pression d'air (0,5 bars) pendant 75 jours.

a- Fraction initiale obtenue après ultrafiltration sur membrane de point de coupure de 10000
b- Fraction retenue sur Sep-Pack C18 puis éluée par le méthanol
c- Fraction éluée par NaOH à 0,75 mol/l
d- Fraction éluée par le mélange Acétone/Eau (1:1 ; v/v)
e- Fraction éluée par par le mélange Méthaol/HCl (qsp pH 2)

Le furfural est formé dans les mêmes conditions à partir des pentoses ou par cyclisation de l'acide ascorbique.

Il était intéressant, dans ces conditions, de rechercher ces produits aussi bien dans les moutardes oxydées sous pression d'oxygène que maintenues sous azote. Les deux produits ont été identifiés par chromatographie HPLC (cf. Matériel et Méthodes) sur des extraits aqueux de moutarde à 20%, après centrifugation.

Les résultats montrent qu'au cours des sept premiers jours de maintien du milieu réactionnel sous oxygène ou sous azote, à 20 comme à 50°C, il ne se forme apparemment pas d'HMF, pas plus que de furfural.

Au-delà de sept jours, on observe toutefois, sur moutarde oxydée sous pression d'air (0,5 bars) et à 50° C, l'apparition d'un pic d'hydroxyméthylfurfural dont l'intensité augmente ensuite au cours du temps.

Dans les tout premiers jours de la réaction, on peut penser que ces composés, très réactifs, sont peut-être formés en faible quantité et orientés vers des réactions de polymérisation, notamment avec des aldoses (URASHIMA et coll., 1988).

Ceci expliquerait la variation de couleur de la moutarde. En effet, la moutarde oxydée à 50° C apparaît nettement brune dès la fin de la première journée d'autooxydation. L'intensité de la coloration s'accroît ensuite au cours du temps.

Comparativement, la moutarde maintenue sous pression élevée d'oxygène (100 bars) et à 20° C contracte une coloration grise, au bout d'une seule journée d'autooxydation, cependant que les teneurs respectives en furfural et en hydroxyméthylfurfural ne sont pas affectées. Ceci constitue un argument important en faveur de la participation de l'HMF et du furfural à la formation de produits de condensation colorés.

Cette observation est pour le moins paradoxale dans la mesure où la formation du furfural et de l'HMF semble facilitée dans un milieu réactionnel sous pression d'air (0,5 bars).

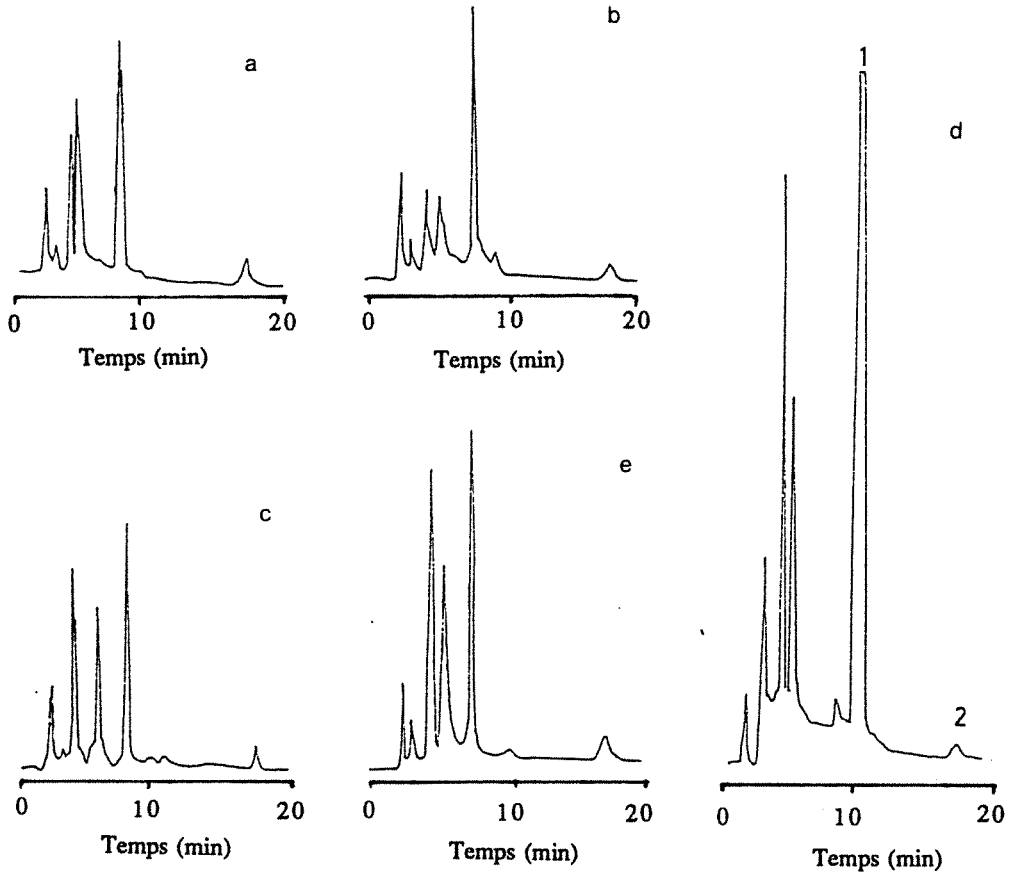


Figure 85 : Evolution de la teneur en furfural et en HMF dans la moutarde non sulfitée autooxydée ou maintenue sous azote.

a- Moutarde fraîche
b- Moutarde autooxydée à 20°C, sous pression d'O_2 (100 bars), pendant 7 jours
c- Moutarde autooxydée à 50°C, sous pression d'O_2 (100 bars), pendant 7 jours
d- Moutarde autooxydée à 50°C, sous pression d'air (0,5 bars), pendant 75 jours
e- Moutarde maintenue à 50°C, sous azote, pendant 7 jours

1. HMF
2. Furfural

Séparation sur colonne HPLC C18. Détection à 280 nm. Elution par le solvant Méthanol/Eau (10:90, v/v).

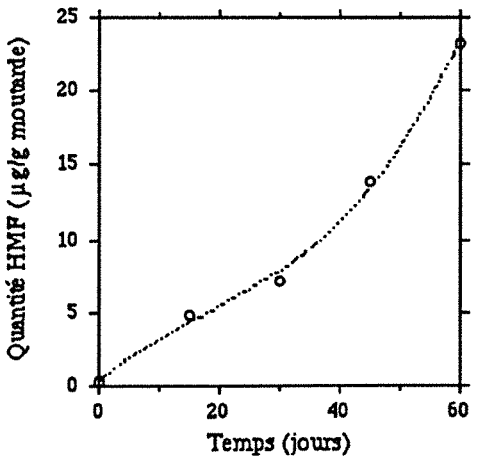


Figure 86 : Evolution de la teneur en hydrométhylfurfural au cours de l'oxydation de la moutarde non sulfitée sous pression d'air (0,5 bars) et à 50°C.

En revanche, dans le cas de la moutarde maintenue sous azote pendant 7 jours à 50° C, la coloration n'est pas modifiée, tandis que l'hydroxyméthylfurfural et le furfural ne peuvent être identifiés au cours de cette période.

Afin d'apporter des arguments complémentaires à la thèse de la formation des intermédiaires de Maillard nous avons tenté de suivre l'évolution de la teneur en azote α-aminé de la moutarde sous azote et sous oxygène.

3. Evolution du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur, par rapport au ferricyanure de potassium, d'une suspension de moutarde non sulfitée est suivi au cours de l'autooxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 20 et à 50°C.

Les résultats montrent qu'à 20°C, la moutarde manifeste une diminution de pouvoir réducteur, suivie, à partir du deuxième jour, d'une augmentation des composés autooxydables.

Parallèlement, la détermination, par la méthode à l'α-α' bipyridyle férrique,des composés rapidement autooxydables traduit la manifestation d'un phénomène semblable (Tableau 41).

En revanche, à 50°C, la formation des composés autooxydables est légérement ralentie. Cependant, la mesure du pouvoir réducteur par rapport au ferricyanure de potassium sur une moutarde autooxydée sous pression d'air (0,5 bars) pendant 75 jours témoigne de la formation de composés réducteurs en quantités importantes.

Par ailleurs, la quantité de composés réducteurs n'est pas modifiée dans une moutarde maintenue sous azote, à 50°C pendant 7 jours.

L'augmentation du pouvoir réducteur au cours de l'autooxydation peut être attribuée à la formation de structure de type α-dicétoniques.

Les résultats montrent également que la méthode à l'α-α' bipyridyle ferrique ne donne pas de résultats significatifs, les substances oxydées par ce réactif étant présentes en quantités faibles. En revanche, la méthode au ferricyanure de potassium permet d'oxyder des

composés présents en quantités plus importantes, les modifications observées au cours de l'auto-oxydation sont significatives, quelle que soit la température.

	Pouvoir réducteur D.O.700nm (Ferricyanure de K)	Pouvoir réducteur D.O.520nm (α-α' bipyridyle fer.)
Moutarde fraîche	0,225	0,036
Moutarde oxydée sous O_2 à J+1 (20°C)	0,151	0,025
Moutarde oxydée sous O_2 à J+2 (20°C)	0,241	0,028
Moutarde oxydée sous O_2 à J+4 (20°C)	0,245	0,040
Moutarde oxydée sous O_2 à J+7 (20°C)	0,251	0,045
Moutarde oxydée sous O_2 à J+1 (50°C)	/	0,031
Moutarde oxydée sous O_2 à J+2 (50°C)	0,153	/
Moutarde oxydée sous O_2 à J+7 (20°C)	0,210	/
Moutarde oxydée à J+75 (50°C)	0,281	/

Tableau 41 : Evolution du pouvoir réducteur de la moutarde non sulfitée autooxydée à 20 et 50°C sous pression d'oxygène (100 bars) ou à 50°C sous pression d'air (0,5 bars).

Le réactif au ferricyanure permet la détermination des substances lentement oxydables telles que glucides réducteurs et lactones, le réactif à l'a-a' bipyridyle ferrique permet la détermination des composés facilement oxydables tels que phénols ou produits de Maillard.

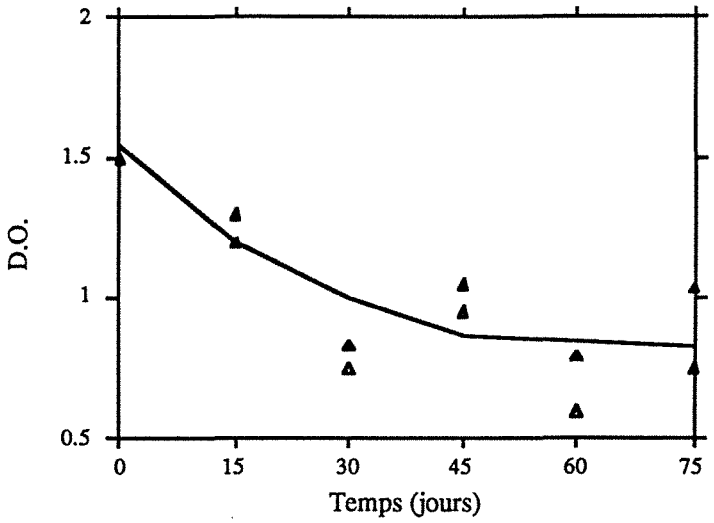
4. Evolution des composés impliqués dans le brunissement non enzymatique

4.1. Composés azotés.

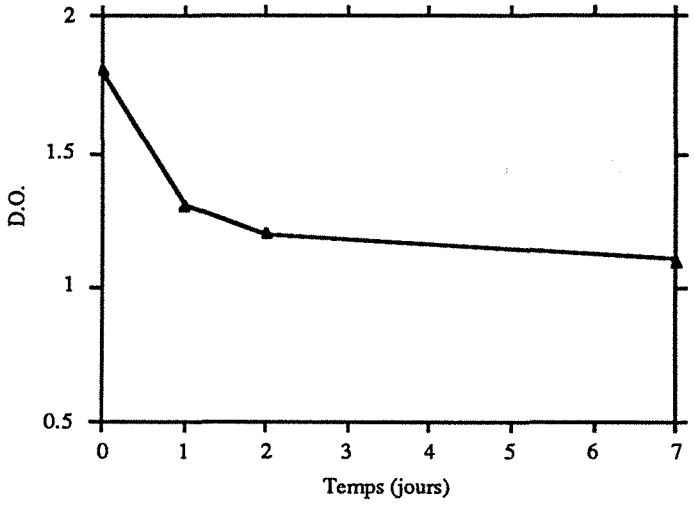
4.1.1. Dérivés α-aminés.

Sous l'effet du maintien de la moutarde à 50°C, la teneur en azote α-aminé, déterminée par dosage au 2-4 dinitrofluorobenzène (cf. Matériel et Méthodes) diminue significativement au cours du temps (Figure 87). Il est opportun de souligner que les acides aminés libres sont présents en quantité notable dans la pâte de moutarde en fin de fabrication (DIAHAM, 1983 ; YOUNIS, 1984).

Ce processus qui met en jeu vraisemblablement des condensations avec d'autres constituants (oses, quinones ?) se développe également dans la moutarde soumise à oxydation sous pression d'oxygène, à température ambiante (20°C). On peut noter toutefois, dans ces conditions que les réactions de Maillard ne semblent pas pour autant privilégiées dans la



- a -



- b -

Figure 87 : Modification de la teneur en dérivés α-aminés dans une moutarde non sulfitée.

a- Moutarde autooxydée sous pression d'air comprimé (0,5 bars), à 50°C.

b- Moutarde autooxydée sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C.

Détermination spectrophotométrique à 420 nm.
Milieu réactionnel :

- Tétraborate de potassium à 5% (p/v)	: 25	ml
- Dinitrofluorobenzène à 1,3% (v/v) dans l'éthanol	: 10	ml
- HCl 2 mol/l	: 1,5	ml
- Extrait de moutarde à 20% en tampon acétate de pH 3,8, après centrifugation	: 100	ml

mesure où le brunissement de cette moutarde ne semble pas corrélé avec la diminution de la teneur en azote α-aminé.

4.1.2. Protéines.

Dans les mêmes conditions, nous avons suivi l'évolution des protéines dans la moutarde non sulfitée, par dosage au réactif de Bradford, au cours de l'oxydation sous oxygène. Les résultats montrent que la teneur en protéines est peu modifiée.

DIAHAM (1983), en revanche, a observé sur moutarde stockée une nette diminution de certaines fractions protéiques au bout de 1 à 4 mois de conservation à 4° comme à 20°C. Il a également montré que la présence de sulfite ne semble pas influencer les modifications de ces protéines.

La durée des essais d'oxydation n'est peut-être pas suffisante pour permettre d'observer cette transformation. Le développement d'un processus d'hydrolyse est en effet prévisible en raison de la température élevée (50° C), et de la nature du milieu acide (pH 3,8). A 20° C, la manifestation d'une hydrolyse enzymatique n'est pas complètement à écarter.

Au cours des réactions de Maillard, la lysine, en raison de son groupement ε-NH_2 est particulièrement impliquée dans les réactions de condensation. D'autres facteurs peuvent affecter également la teneur en acides aminés dans le milieu : le dioxyde de soufre notamment, dans le cas du tryptophane, la condensation aminoacide - polyphénols en présence d'oxygène et de métaux lourds (Cu^{2+}, Fe^{2+}).

Afin de confirmer le rôle de l'azote α-aminé dans les réactions de brunissement, il était opportun, en même temps, de s'assurer de la participation des glucides réducteurs aux changements de couleur de la moutarde. Pour cela, nous avons suivi l'évolution de la teneur en oses simples d'une moutarde non sulfitée, oxydée à 50° C sous pression d'oxygène.

4.2. Glucides

4.2.1. Oses libres.

Selon FOURNIER et VANGHEESDAELE (1980), la pâte de moutarde contient de l'ordre de 10 % (p/p) de glucides par rapport à la matière sèche. Ces oses sont présents à la

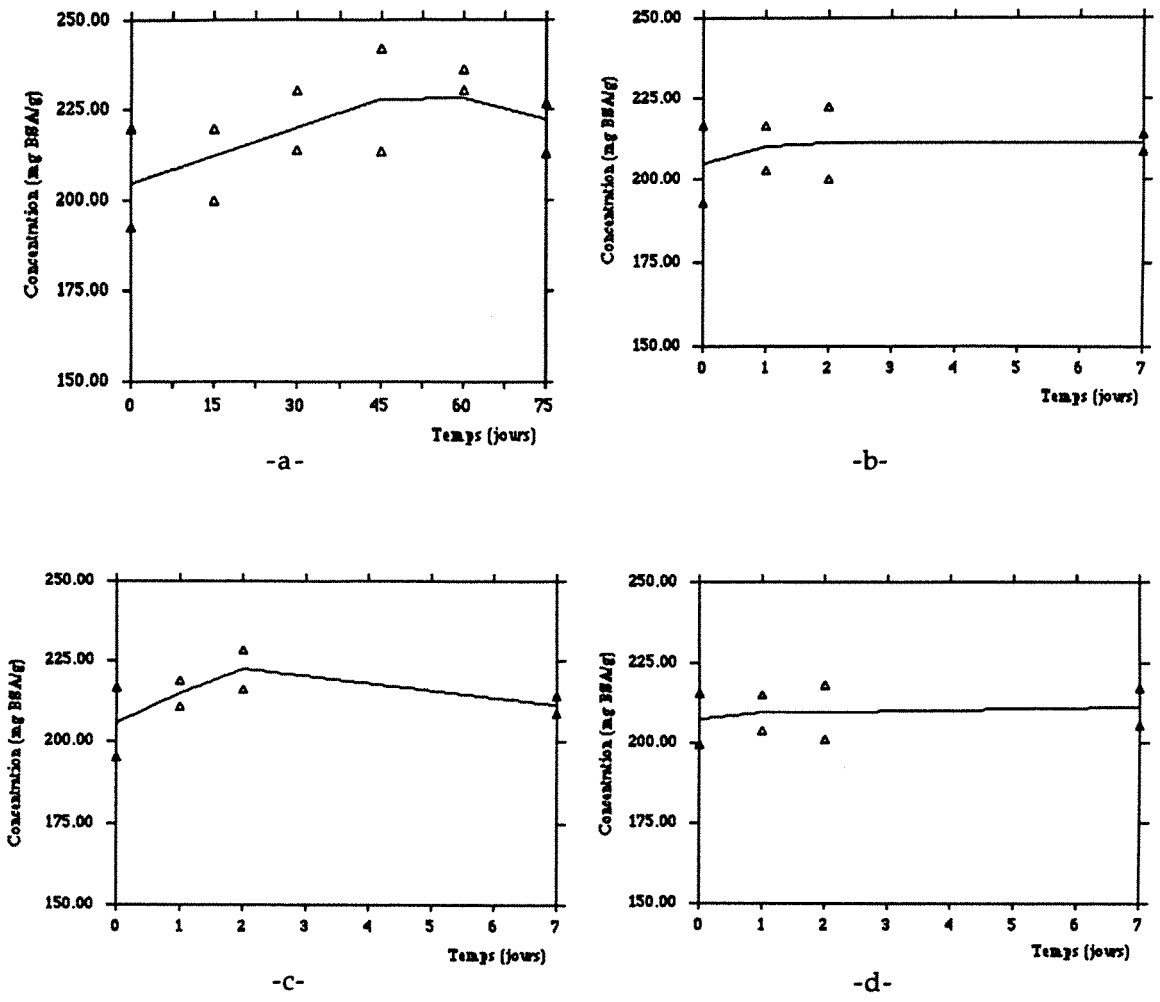


Figure 88 : Evolution des protéines au cours de l'autooxydation de la moutarde non sulfitée (Dosage par la méthode de Bradford)

a. Autooxydation sous air comprimé (0,5 bars) à 50°C pendant 75 jours.

b. Autooxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C pendant 7 jours

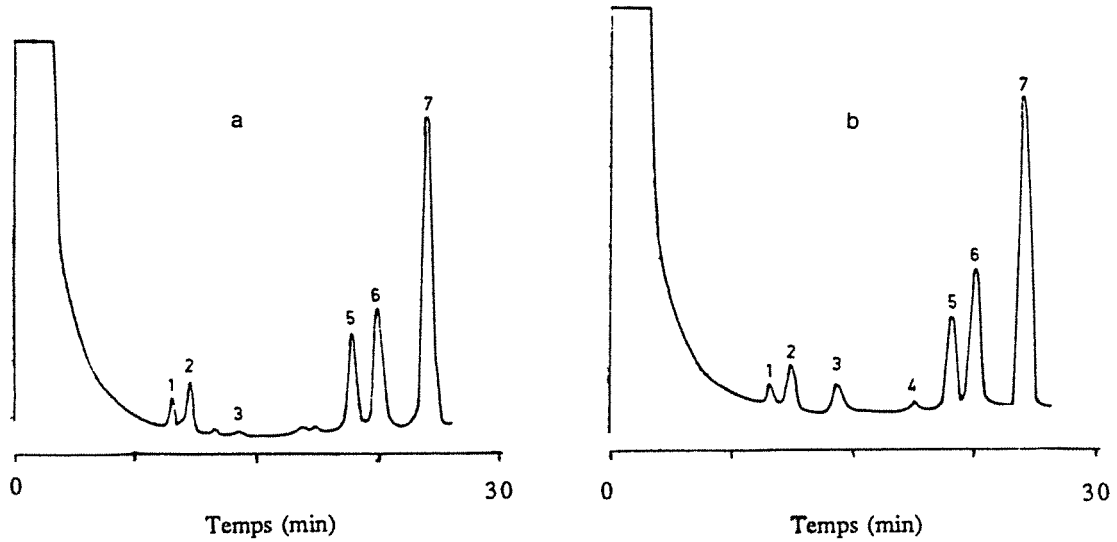
c. Autooxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C pendant 7 jours.

d. Autooxydation sous azote, à 50°C pendant 7 jours

fois sous forme libre et sous forme combinée, notamment sous forme de polymères constitués d'arabinose et de galactose, responsables des propriétés fonctionnelles de la moutarde (mucilages). Les celluloses et hémicelluloses, autres constituants importants de la graine de *B. juncea*, sont éliminés lors de la fabrication (trempage et tamisage).

Des oligosides tels que le saccharose et le stachyose (Gal-Gal-Gluc-Fruc) ont également été identifiés par ROSTEIN (1982).

L'analyse, par CPG, des oses libres contenus dans la moutarde soumise à l'oxydation à 50°C permet de montrer que les glucides, y compris les oses libres, sont peu affectés par le traitement thermique. On observe tout au plus une légère augmentation de la proportion de galactose et d'arabinose libres dans la moutarde non sulfitée, à la suite vraisemblablement d'un processus d'hydrolyse des polyosides, sous l'action combinée de la température et du pH (Figure 89).



(a) Moutarde fraîche (b) Moutarde oxydée

Figure 89 : Evolution de la teneur en oses libres contenus dans la moutarde non sulfitée, après oxydation à 50°C, sous pression d'air comprimé (0,5 bars), pendant 75 jours.

Chromatographie en phase gazeuse sur colonne NPGS 5%.

1. Rhamnose
2. Fucose
3. Arabinose
4. Mannose
5. Glucose
6. Galactose
7. Etalon interne : Inositol

Oses	Concentration (mg/g) Moutarde fraîche	Concentration (mg/g) Moutarde oxydée
Rhamnose	0.02	0.02
Fucose	0.45	0.42
Arabinose	0.11	0.50
Mannose	0.06	0.06
Glucose	2.84	2,98
Galactose	3.05	4,35

Tableau 42 : Concentration en oses libres dans la pâte de moutarde fraîche et oxydée pendant 75 jours à 50°C, sous pression d'air (0,5 bars).

Ce processus est vraisemblablement corrélé avec la modification de la texture de la moutarde, en particulier avec la synérèse. FOURNIER et VANGHEESDAELE (1980) ont, en effet, apporté la preuve que les mucilages étaient directement impliqués dans le maintien de la texture de la moutarde.

Ces mêmes auteurs ont également montré que le vieillissement de la moutarde entraîne une hydrolyse du saccharose et du stachyose. En revanche, les proportions de galactose et d'arabinose ne sont pas affectées, parce qu'il n'existe pas de dépolymérisation enzymatique des arabinogalactanes au cours de la conservation de la moutarde. On peut donc en conclure qu'à 50° C et en milieu acide (pH 3,8), il s'agit bien d'une hydrolyse non enzymatique des arabinogalactanes de la moutarde.

4.2.2. Acide galacturonique.

L'acide galacturonique est le constituant principal des pectines où il est présent sous forme d'unités plus ou moins méthylées, reliées entre elles par des liaisons α-(1-4). A ces chaînes d'acide galacturonique sont attachés des oses neutres, principalement du L-Rhamnose, du L-Arabinose, du D-Galactose et du D-Xylose. YOUNIS (1984) a pu identifier deux types de pectines dans la graine de moutarde : les pectines des pellicules d'une part et celles contenues dans l'amande d'autre part. Ces dernières, particulièrement riches en glucose (13%) et mannose (4%), se retrouvent dans la pâte après fabrication.

L'analyse spectrophotométrique, par la méthode au méta-phényl phénol (cf. Matériel et Méthodes), du contenu en acide galacturonique d'une moutarde oxydée à 50°C fait apparaître une augmentation significative de la teneur en acide galacturonique libre dans le milieu. Cet acide provient sans doute de l'hydrolyse des pectines. L'acide libre est ensuite soit dégradé, soit impliqué dans des réactions de condensation, comme semblent le confirmer les résultats de la figure 90.

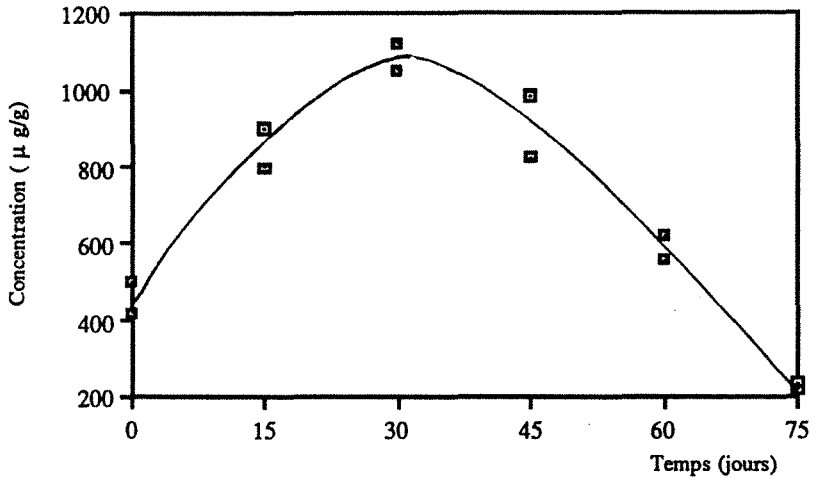


Figure 90 : Evolution de la teneur en acide galacturonique dans la moutarde non sulfitée oxydée à 50°C, sous pression d'air (0,5 bars).

Détermination spectrophotométrique par le réactif méta-phénylphénol/H_2SO_4 (λmax = 520 nm)

Ces résultats tendent à conforter à la fois l'hypothèse de la dépolymérisation d'une partie des polyosides quand la moutarde est oxydée et portée à 50° C, en même temps que la participation vraisemblable de l'acide galacturonique à des réactions de condensation avec les composés α-aminés.

5. Conclusion

Nous avons pu montrer que la température et l'oxygène sont deux facteurs déterminants pour le développement des produits de brunissement non enzymatique.

La formation de furfural est mise en évidence uniquement dans une moutarde oxydée à 50°C, après manifestation d'un brunissement intense. Ce processus constitue un argument de poids en faveur de la polycondensation de ce composé très réactif. Parallèlement, nous avons observé la formation accrue de composés réducteurs que l'on peut attribuer à des réductones dans le milieu réactionnel.

L'étude de la transformation des constituants directement impliqués dans l'élaboration des produits de brunissement non enzymatique confirme, une fois encore, le rôle déterminant de la température dans l'évolution du processus.

Par ailleurs, l'analyse des oses libres, au cours de l'autooxydation à 50°C témoigne de l'existence d'un processus de dépolymérisation des polyosides. Il convient également de noter que leur faible teneur (de l'ordre de 7 mg/g de moutarde) est sans commune mesure avec les quantités de dérivés α-aminés impliqués dans les réactions de polycondensation.

Il y a tout lieu de penser, dans ces conditions, que l'acide galacturonique libre, présent en quantité relativement importante dans la moutarde (de l'ordre de 1 mg/g de moutarde, soit 5 µmol/g), peut être impliqué dans les réactions de condensation avec les dérivés α-aminés ; cette réaction est sans doute la principale cause du brunissement non enzymatique de la moutarde. Il convient également d'ajouter que l'acide galacturonique libéré par hydrolyse des pectines peut contribuer en même temps à l'accroissement du pouvoir réducteur de la moutarde.

Nous nous sommes également intéressés à l'oxydation des lipides non saturés de la moutarde, en remarquant toutefois que le rancissement d'une moutarde semble apparemment un processus beaucoup moins rapide que le brunissement.

V. ETUDE DE L'OXYDATION DES LIPIDES.

1. Généralités.

La moutarde est riche en lipides. Selon LECHNER et KESZTHELYI (1986), ils représentent environ 30 % du poids de la graine de *B. juncea*.

Ce sont surtout les acides gras insaturés qui risquent d'être dégradés au cours de l'autooxydation. A ce sujet, il convient de rappeler que l'activité lipoxygénasique est pratiquement absente de la graine de B. juncea, ce qui laisse supposer que l'autooxydation, catalysée ou non par des cations de métaux lourds, est le principal mécanisme de peroxydation et de rancissement des lipides non saturés de la pâte de moutarde.

D'après MÖRSEL (1990), le mécanisme radicalaire de l'autooxydation pourrait mettre en oeuvre les réactions suivantes :

$$RH \longrightarrow R^\circ + H^\circ$$

$$R^\circ + O_2 \longrightarrow RO^\circ$$

$$R'OO^\circ + RH \longrightarrow R'OOH + R^\circ$$

$$ROOH \longrightarrow RO^\circ + {}^\circ OH$$

$$2\,ROOH \longrightarrow ROO^\circ + RO^\circ + H_2O$$

$$R^\circ + R'^\circ \longrightarrow R.R'$$

$$ROO^\circ + R'^\circ \longrightarrow ROR'$$

$$2\,ROO^\circ \longrightarrow ROH + RO + O_2$$

$$2\,ROO^\circ \longrightarrow ROOR + O_2$$

en remarquant que la température et certains cations des métaux lourds (Cu^{2+}, Fe^{3+}) accélèrent la vitesse de la réaction en augmentant le nombre de radicaux R° :

$$RH + Me^{+(n+1)} \longrightarrow R^\circ + H^+ + Me^{+n}$$

et la dégradation des hydroperoxydes :

$$ROOH + Me^{2+} \longrightarrow ROO^{\circ} + Me^{+} + H^{+}$$

$$ROOH + Me^{+} \longrightarrow RO^{\circ} + Me^{2+} + OH^{-}$$

La température et la présence de certains métaux (Cu^{2+} et Fe^{3+} notamment) accélèrent la vitesse de la réaction

L'oxydation directe des lipides peut se faire par l'intermédiaire de la peroxydase.

Ainsi, NIINOMI et coll. (1987) ont mis en évidence la peroxydation de l'acide linoléique par le système POD/H_2O_2/Monophénol. La réaction s'accompagne de la formation transitoire d'un radical libre phényl. Dans ces conditions, les produits formés sont identiques à ceux obtenus par la réaction lipoxygénasique : acide 13-hydroperoxy-9-11, octadécadiénoique et acide 9-hydroperoxy-10-11, octa-décadiénoique.

La peroxydase est également capable de réduire les hydroperoxydes formés au cours de l'étape d'autooxydation en alcool correspondant (YAMAGUCHI, 1980 ; WELLER et coll., 1985). La présence d'un atome de fer dans le noyau héminique de la peroxydase permet d'expliquer, par un mécanisme similaire à celui décrit par MÖRSEL (1990), l'action de l'enzyme sur les hydroperoxydes lipidiques. Toutefois, cette réaction nécessite la présence, dans le milieu réactionnel, d'un réducteur capable de régénérer l'enzyme (Figure 91). Selon WELLER et coll. (1985), les composés phénoliques constituent de bons réducteurs pour cette réaction. Toutefois, il convient de noter que, selon LINDSTOM et AUST (1984), la peroxydase de raifort n'a que peu d'affinité pour les hydroperoxydes lipidiques.

L'activité lipoxygénasique étant vraisemblablement absente de la pâte de moutarde, il y a tout lieu de penser que le processus d'oxydation des lipides non saturés est essentiellement de nature chimique.

Il convient d'ajouter que les lipides peuvent être dégradés directement, par un mécanisme de photooxydation, en présence de photosensibilisateur, activé par la lumière.

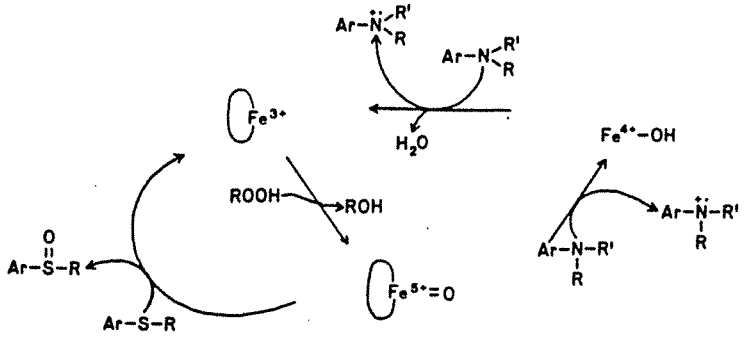


Figure 91 : Cycle catalytique pour la réduction des hydroperoxydes par les peroxydases (d'après WELLER et coll., 1985)

Deux mécanismes peuvent être envisagés : le passage du photosensibilisateur de l'état fondamental à un état activé, de niveau d'énergie supérieur ou le passage à un état singulet, puis triplet (MÖRSEL, 1990). La riboflavine se comporte suivant le premier mécanisme, alors que le second est plutôt caractéristique de composés tels que chlorophylle, phaeophytine, protoporphyrines et érythrosine.

La photooxydation peut intervenir dans une moutarde exposée à la lumière. En effet, on observe, dans le cas de pots entreposés à la lumière, une nette décoloration, couplée à un brunissement. On peut donc penser que les pigments caroténoïdes de la moutarde, en absorbant la lumière sont photosensibilisés, ce qui entraîne leur dégradation (décoloration) et en même temps leur confère une grande réactivité à l'égard des systèmes non saturés.

Les hydroperoxydes lipidiques peuvent réagir avec divers composés, en faisant intervenir un mécanisme radicalaire. Ce type de réaction a été observé avec les protéines, les acides aminés et les amines (GARDNER, 1979 ; POKORNY, 1981). La réaction est accélérée par la présence de cations métalliques ou de métalloprotéines. Certains acides aminés sont, à cet égard, particulièrement réactifs : cystéine et cystine, tryptophane et histidine notamment.

Les étapes de propagation et de terminaison peuvent conduire à la polycondensation des protéines entre elles et à la condensation entre protéines et lipides ; les produits de polycondensation ainsi formés sont colorés en brun (POKORNY, 1981).

$$ROOH + Fe^{3+} \longrightarrow ROO^{\circ} + H^{+} + Fe^{2+}$$

$$ROOH + Fe^{2+} \longrightarrow RO^{\circ} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

$$PH + ROO^{\circ} \longrightarrow ROOH + P^{\circ}$$

$$PH + RO^{\circ} \longrightarrow ROH + P^{\circ}$$

$$P^{\circ} + P^{\circ} \longrightarrow P - P$$

Mécanisme réactionnel entre hydroperoxydes et protéines

ROOH : Hydroperoxyde, P : Protéine

Les réactions d'oxydation participent à l'élaboration et à la modification des produits d'arômes ainsi qu'au développement des flaveurs anormales dans les produits alimentaires (rancissement) (GROSCH, 1989).

En raison de leur grande réactivité, les sulfites peuvent participer à la décomposition des lipides : en présence d'oxygène, ils sont capables d'oxyder les acides gras, en initiant des réactions radicalaires (LAMIKANRA, 1982 ; OZAWA et KWAN, 1986) :

$$SO_3^{2-} + O_2 \longrightarrow SO_3^{-\circ} + O_2^{-\circ}$$

$$RH + SO_3^{-\circ} \longrightarrow R^{\circ} + H^{+} + SO_3^{2-}$$

$$R^{\circ} + O_2 \longrightarrow ROO^{\circ}$$

Ils contribuent également à la décomposition des hydroperoxydes :

$$ROOH + SO_3^{2-} \longrightarrow RO^{\circ} + SO_3^{-\circ} + OH^{-}$$

Dans ce contexte, nous avons été amenés à étudier la transformation des lipides de la moutarde non sulfitée par autooxydation.

2. Analyse des pigments liposolubles.

Ces pigments sont extraits de la moutarde à 20% en tampon acétate de pH 3,8, à l'aide de différents solvants apolaires : hexane, éther éthylique ou encore éther éthylique suivi de méthanol. L'extrait est analysé par spectrophotométrie U.V-Visible.

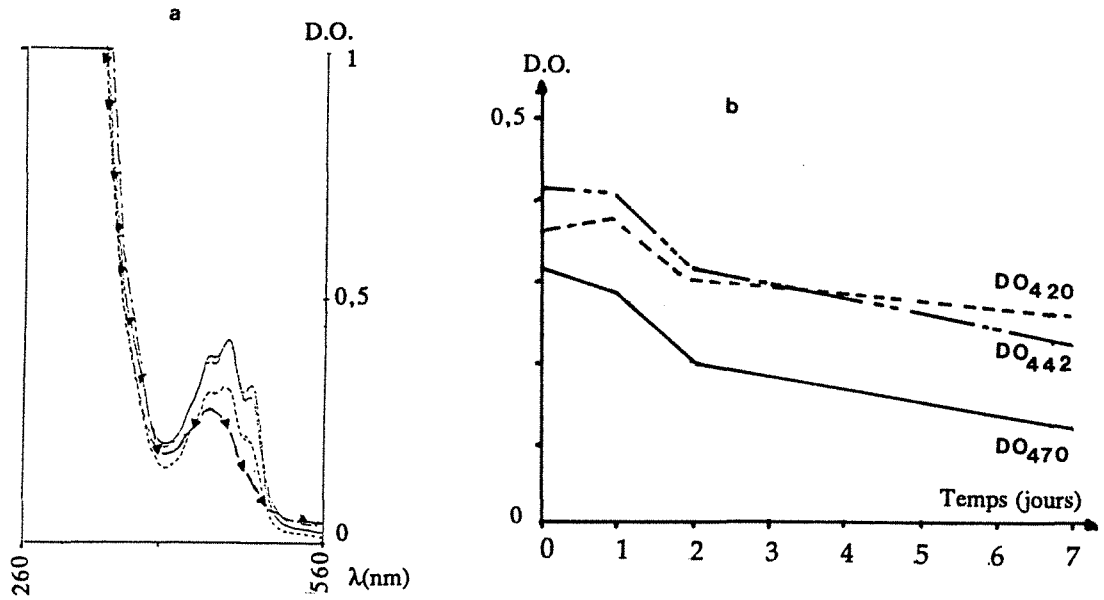


Figure 92 :

a. Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits à l'éther éthylique.

- ——— Moutarde fraîche
——— Moutarde oxydée 24 heures sous pression d'O_2 (100 bars), à 20°C
------ Moutarde oxydée 48 heures sous pression d'O_2 (100 bars), à 20°C
——▲ Moutarde oxydée 7 jours sous pression d'O_2 (100 bars), à 20°C

b. Evolution des pics d'absorption caractéristiques de la moutarde extractibles à l'éther, au cours de l'oxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 20°C.

Le spectre d'absorption UV-Visible de l'extrait éther éthylique obtenu à partir de la moutarde fraîche à 20% en tampon acétate pH 3,8 (cf. Matériel et Méthodes), est caractérisé par la présence de bandes à 420, 445 et 470 nm que l'on peut imputer aux caroténoïdes.

Les essais d'autooxydation sous pression d'oxygène (100 bars) et à 20°C (Figure 92) comme à 50°C (Figure 93) entraînent la disparition des caroténoïdes. Les pigments sont facilement oxydés, ce qui se traduit par une décoloration de la moutarde.

Toutefois, une moutarde oxydée en présence d'air (0,5 bars) pendant 7 jours, à 50° C, donne lieu à une diminution lente de la teneur en caroténoïdes, avec disparition totale seulement au bout de 60 jours (Figure 94). Cette dégradation est accompagnée de la formation de composés nouveaux, absorbant vers 380 nm, que nous n'avons pas identifiés.

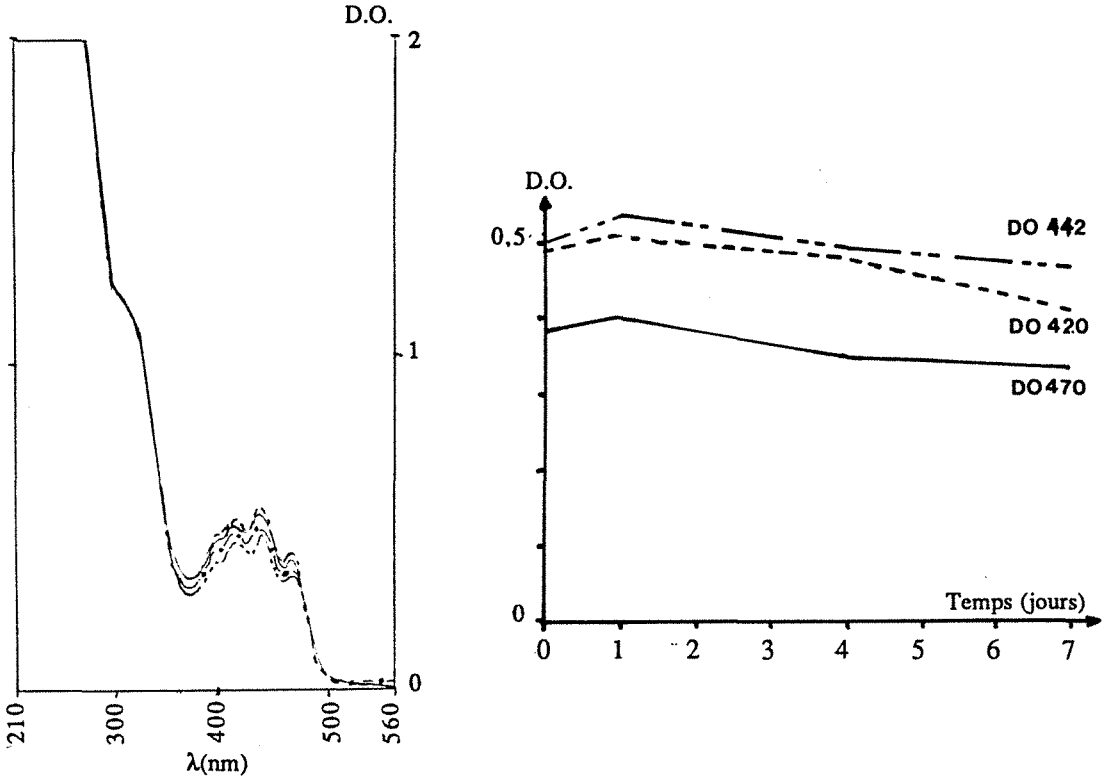


Figure 93 :

a. Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits à l'éther éthylique.

1. Moutarde fraîche ————
2. Moutarde oxydée 24 heures sous pression d'O_2 (100 bars), à 50°C - - - - -
3. Moutarde oxydée 48 heures sous pression d'O_2 (100 bars), à 50°C —•—
4. Moutarde oxydée 7 jours sous pression d'O_2 (100 bars), à 50°C —— - - -

b. Evolution des pics d'absorption caractéristiques de la moutarde extractibles à l'éther, au cours de l'oxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C.

Les caroténoïdes ne sont qu'en partie détruits au bout de 7 jours à 50° C et sous azote (Figure 95). La vitesse de disparition de ces pigments est cependant beaucoup plus lente que dans le cas d'une moutarde autooxydée sous air comprimé ou sous oxygène pur.

A température ambiante (20°C), sous forte pression d'oxygène (100 bars), les bandes caractéristiques des caroténoïdes disparaissent plus rapidement que dans le cas d'une moutarde auto-oxydée à 50° C, sous air comprimé (0,5 bars). Dans ces conditions, la coloration jaune de la moutarde est disparue au bout d'une journée d'auto-oxydation.

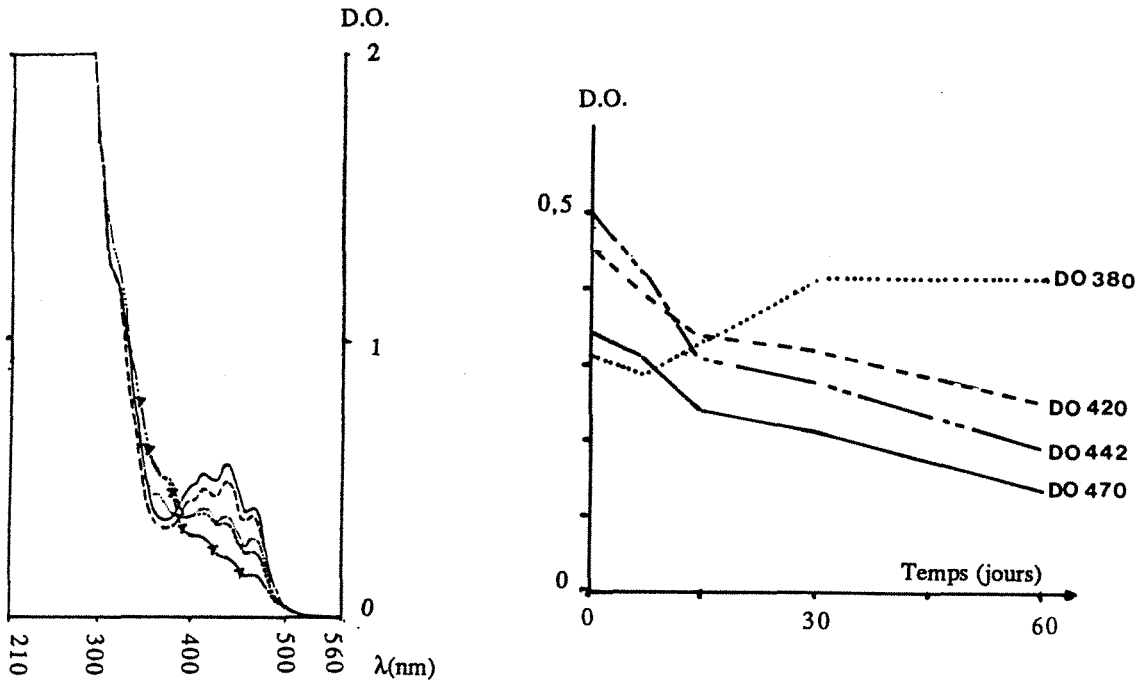


Figure 94 :

a. Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits à l'éther éthylique.

Moutarde fraîche ————
Moutarde oxydée 7 jours sous pression d'air (0,5 bars), à 50°C — — — —
Moutarde oxydée 15 jours sous pression d'air (0,5 bars), à 50°C————····
Moutarde oxydée 30 jours sous pression d'air (0,5 bars), à 50°C- - - - - - - -
Moutarde oxydée 60 jours sous pression d'air (0,5 bars), à 50°C —▲——

b. Evolution des pics d'absorption caractéristiques de la moutarde extractibles à l'éther, au cours de l'oxydation sous pression d'oxygène (100 bars), à 50°C.

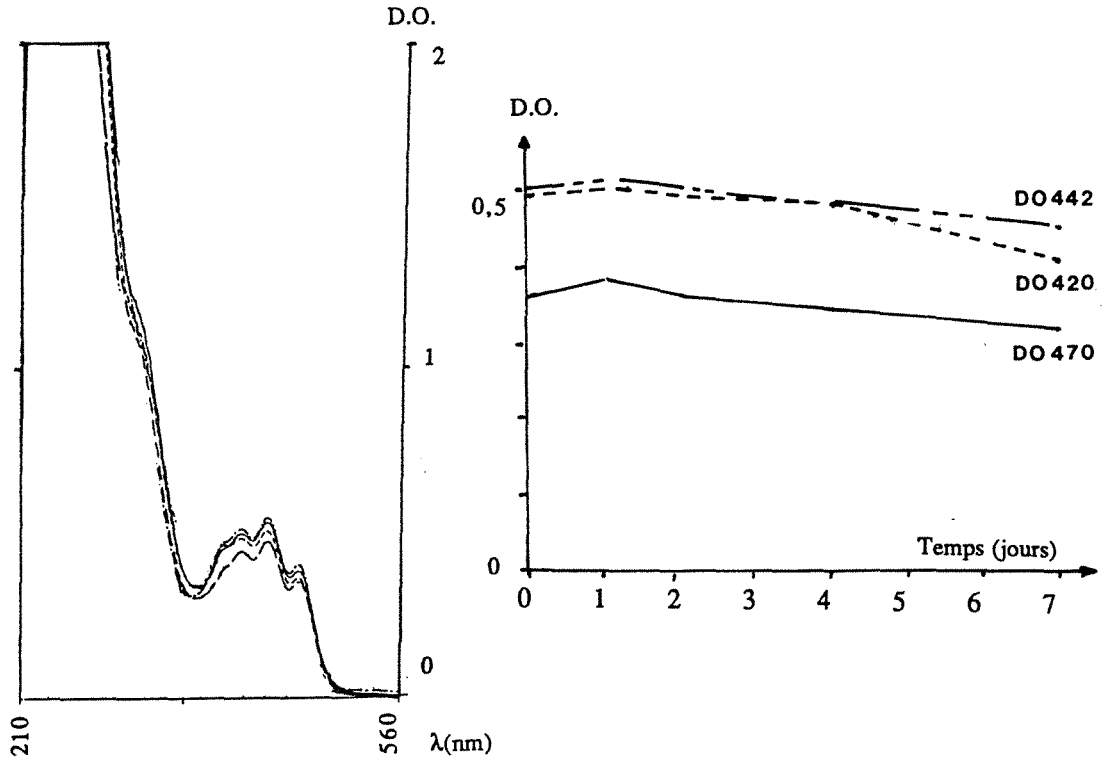


Figure 95 :

a. Spectre d'absorption des constituants de la moutarde extraits à l'éther éthylique.

Moutarde fraîche ————
Moutarde maintenue 1 jour sous azote (0,5 bars), à 50°C. ——— -
Moutarde maintenue 2 jours sous azote (0,5 bars), à 50°C. .....
Moutarde maintenue 4 jours sous azote (0,5 bars), à 50°C. - - - - - - -
Moutarde maintenue 7 jours sous azote (0,5 bars), à 50°C. -— — —

b. Evolution des pics d'absorption caractéristiques des composés extraits par l'éther à partir d'une moutarde non sulfitée maintenue sous azote (0,5 bars) et à 50°C.

SUZUKI & coll. (1989) ont montré récemment l'importance des caroténoïdes dans l'oxydation de certaines huiles.

Ce rôle prooxydant peut être attribué à l'oxygénation du β-carotène, en présence de différents oxydants. La manifestation d'un effet prooxydant a été également signalée par YANG (1984) pour les sulfites. En présence d'ion Mn^{2+} et d'oxygène, le β-carotène est oxydé selon un mécanisme radicalaire.

$SO_3^{2-} + Mn^{2+} + O_2 \longrightarrow O_2^- + SO_3^{-\circ} + Mn^{2+}$

β carotène $+ O_2^{-\circ} + H^+ \longrightarrow \beta$ carotène° $+ H_2O_2$

β carotène $+ SO_3^{-\circ} \longrightarrow \beta$ carotène° $+ H^+ + SO_3^{2-}$

β carotène° $+ O^2 \longrightarrow \beta$ carotène -O-O°

β carotène OO° $\longrightarrow$ produits d'oxydation.

D'une façon générale, l'oxydation peut être induite par les radicaux superoxydes ou OH°. C'est pourquoi il est probable, dans le cas de la pâte de moutarde, que la peroxydase est plus particulièrement impliquée dans un tel processus (KANNER et coll., 1977, KANNER et KINSELLA, 1983).

3. Oxydation des acides gras.

L'étude a été menée à la fois sur les acides gras présents dans la moutarde sous formes libres en même temps sur les acides gras estérifiés.

3.1. Acides gras libres

L'analyse chromatographique montre que les acides gras libres sont présents en quantités faibles. On note une proportion relativement élevée d'acides gras insaturés C_{18}=1, C_{18}=2, C_{18}=3, C_{20}=1 et C_{22}=1.

L'oxydation de la moutarde sous pression d'oxygène (100 bars), aussi bien à 50° C qu'à 20° C, ne fait pas apparaître de modification caractéristique de la répartition de ces

acides. On obtient des résultats identiques avec le maintien des moutardes sous azote, aux températures.de 20 et 50°C.

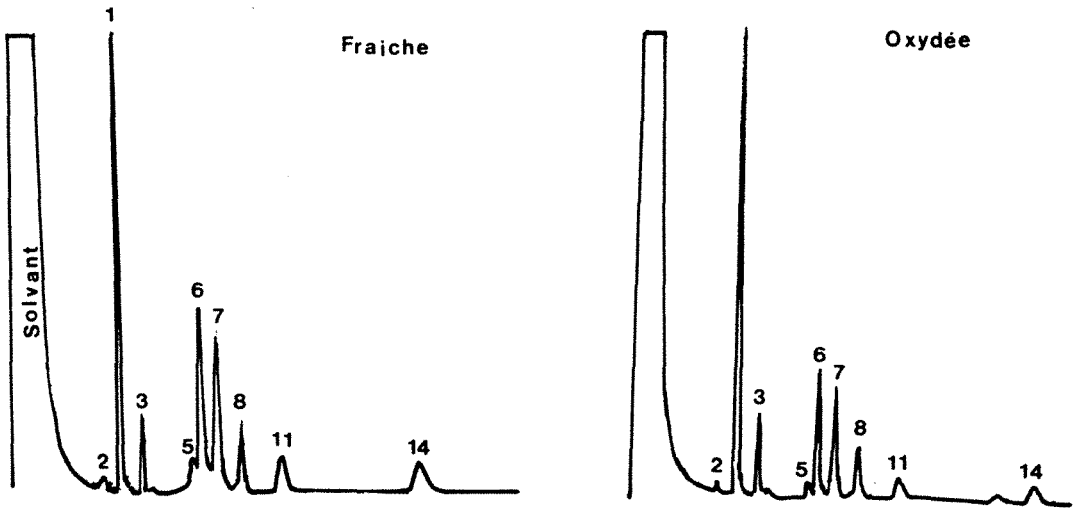


Figure 96 : Composition en acides gras dans la fraction "Acides gras libres" extraite d'une moutarde non sulfitée oxydée sous air comprimé (0,5 bars) pendant 30 jours à 50°C.

1. Acide pentadécanoique (C15=0) (Etalon interne)
2. Acide myristique (C14=0)
3. Acide palmitique (C16=0)
4. Acide palmitoléique (C16=1)
5. Acide stéarique (C18=0)
6. Acide oléique (C18=1)
7. Acide linoléique (C18=2)
8. Acide linolénique (C18=3)
9. Acide arachidique (C20=0)
10. Acide eicosaénoique (C20=1)
11. Acide eicosadiénoique (C20=2)
12. Acide eicosatriénoique (C20=3)
13. Acide docosanoique (C22=0)
14. Acide érucique (C22=1)

D'autre part, l'oxydation de la moutarde sous air comprimé (0,5 bars) pendant 75 jours à 50°C, ne donne pas lieu à une diminution significative des différents acides gras. Même à 50° C, les acides gras insaturés ne semblent pas affectés.

3.2. Esters d'acides gras

Les lipides de la graine de moutarde sont formés essentiellement de glycérides, beaucoup plus abondants que les acides gras libres.

Les acides gras engagés dans ces structures sont essentiellement des acides de chaîne carbonée comprise entre 16 et 24 atomes de carbone. Parmi ces composés, on note une forte proportion d'acides gras insaturés : C18=1, C18=2, C18=3, C20=2, C22=1 (Figure 97).

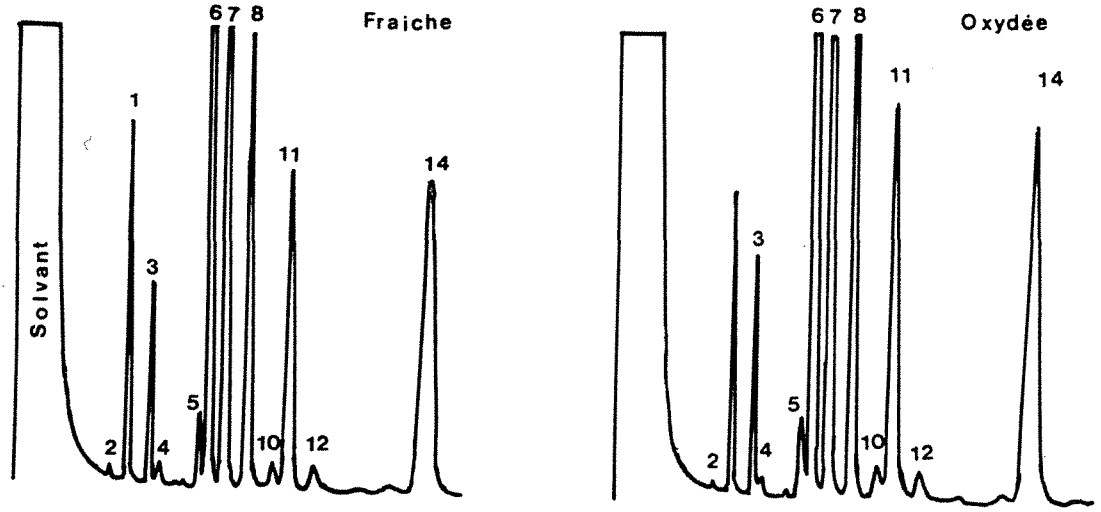


Figure 97 : Composition en acides gras de la fraction estérifiée (glycérides) extraite d'une moutarde non sulfitée, oxydée sous air comprimé (0,5 bars) pendant 30 jours à 50°C.

1. Acide pentadécanoique (C15=0) (Etalon interne)
2. Acide myristique (C14=0)
3. Acide palmitique (C16=0)
4. Acide palmitoléique (C16=1)
5. Acide stéarique (C18=0)
6. Acide oléique (C18=1)
7. Acide linoléique (C18=2)
8. Acide linolénique (C18=3)
9. Acide arachidique (C20=0)
10. Acide eicosaénoique (C20=1)
11. Acide eicosadiénoique (C20=2)
12. Acide eicosatriénoique (C20=3)
13. Acide docosanoique (C22=0)
14. Acide érucique (C22=1)

Au cours des essais d'autooxydation de longue durée (7 jours) que l'on fait subir à la moutarde non sulfitée, les acides gras ne sont pas oxydés ; même à 50° C et sous forte pression d'oxygène (100 bars) les acides insaturés ne semblent pas avoir fait l'objet de transformations notables. Cette observation fondamentale tend à confirmer que les acides gras non saturés sont protégés de l'autooxydation par les autres constituants de la moutarde. il apparaît, dans ce contexte, que les réactions de brunissement liées à l'absorption de l'oxygène sont beaucoup plus rapides que les réactions d'oxydation des lipides insaturés.

Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec la recherche de la présence de malonaldéhyde dans la moutarde oxydée. Ce composé carbonylé, réactif, est formé au cours de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés. Malgré plusieurs tentatives d'isolement et d'identification par l'intermédiaire de l'acide thiobarbiturique (cf. Matériel et Méthodes), nous ne sommes pas parvenu à confirmer sa formation dans les moutarde oxydées pendant 7 jours sous pression d'oxygène (100 bars), à 20 et à 50°C.

La présence de malonaldéhyde a toutefois pu être mise en évidence dans une moutarde oxydée pendant 15 jours sous pression d'oxygène, à 50°C, ce qui correspond à des conditions très drastiques. Cependant, l'analyse des acides gras dans cette même moutarde ne nous a pas permis d'observer une diminution significative d'une espèce moléculaire particulière d'acide gras insaturé.

En conclusion, on peut donc dire que les acides gras d'une moutarde sulfitée ou non sont très peu affectés par l'autooxydation.

Ces observations permettent donc de penser que les autres constituants de la moutarde exercent un rôle protecteur déterminant à l'égard de la peroxydation des lipides non saturés. Il convient, dans ce contexte, de rappeler l'importance des cations métalliques dans les mécanismes d'oxydations des lipides et de remarquer que, paradoxalement, leur présence dans la moutarde semble peu affecter la composition en acides gras au cours de l'autooxydation.

Les cations métalliques participent activement à la formation des radicaux libres et aux phénomènes d'oxydation. C'est la raison pour laquelle il nous a semblé opportun d'estimer l'importance de leur contribution au processus d'oxydation de la moutarde.

VI. DOSAGE DU FER

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au fer, présent en plus grande quantité dans la moutarde. En effet, selon VANGHEESDAELE et FOURNIER (1977) la teneur moyenne en fer dépend de l'origine de la graine et surtout du procédé de fabrication utilisé. Pour les différentes moutardes qu'ils ont étudiées, la concentration en fer varie entre 15 et 23 mg/kg de matière sèche.

Le dosage du fer dans la moutarde par absorption atomique révèle des concentrations en fer plus faibles. Ce déficit relatif est vraisemblablement lié aux améliorations technologiques apportées à la fabrication de la moutarde depuis 1977 et notamment l'utilisation des broyeurs URSCHEL pour concasser les graines.

	Moutarde fraîche	Moutarde oxydée
Fer total (mg/kg ES)	9,6	9,6
Fer soluble (mg/kg ES)	6,5	6,0
Fer lié (mg/kg ES)	3,1	3,6

Tableau 43 : Teneurs en fer de la pâte de moutarde.
Moutarde fraîche et moutarde oxydée sous oxygène (100 bars) pendant 15 jours à 50°C.

Le dosage du fer nous montre également que la quantité de fer soluble diminue dans une moutarde oxydée à 50° C, sous atmosphère d'oxygène.

On peut supposer que l'oxydation entraîne une chélation du cation. On ne peut pas toutefois affirmer si ce phénomène est la cause ou la conséquence de l'oxydation.

VII. CONCLUSION.

Il ressort de cette étude que la moutarde non sulfitée est soumise à des réactions de brunissement enzymatique, qui affectent essentiellement les phénols, ainsi qu' à des réactions de brunissement non enzymatique, faisant intervenir protéines et glucides. L'importance

relative de chaque type de réaction dépend de la température d'oxydation. C'est pourquoi cette étude met particulièrement en évidence le rôle important de l'oxygène moléculaire dans le processus d'oxydation.

Les lipides de la moutarde sont peu sensibles à l'autooxydation sauf les pigments caroténoïdes qui sont en grande partie dégradés au cours de ce processus, dans lequel la concentration en oxygène dissous est un facteur déterminant.

Les réactions de rancissement sont moins rapides que les réactions de brunissement. Néanmoins, l'apparition de produits d'oxydation des acides gras pour des expositions prolongées à l'oxygène (15 jours à 50°C, sous 100 bars de pression) témoignent de la manifestation d'un rôle protecteur de certains constituants de la moutarde vis-à-vis de l'oxydation des lipides.

Dans ce contexte, il convient de noter la formation à 50°C, dans ce milieu, de mélanoidines, intermédiaires fondamentaux du brunissement non enzymatique. Or, les propriétés antioxydantes de ces constituants ont été démontrées par de nombreux auteurs, les mélanoidines pourraient donc assurer, la protection des acides gras non saturés contre l'oxydation. D'autre part, de nombreux auteurs ont mis en évidence la chélation de cations métalliques, tels que le fer, par les mélanoïdines. Citons notamment les travaux de HOMMA et coll. (1986), sur les propriétés chélatantes des pigments du café, ceux de HASHIBA (1986), qui mettent en évidence, sur des systèmes modèles, l'augmentation de l'intensité de la coloration des mélanoidines quand elles chélatent les cations Fe^{3+}, et enfin les observations plus anciennes de GOMYO et HORIKOSHI (1976), qui portent également sur des systèmes modèles.

Nous avons pu montrer que l'autooxydation de la moutarde à 50°C, sous pression d'air, s'accompagne d'une chélation des atomes de fer, mesurée par spectrométrie d'absorption atomique. L'apparition simultanée dans le milieu, de pigments bruns en quantités importantes nous inclinent à penser que ces cations métalliques sont soumis à chélation par les mélanoïdines. On peut donc penser qu'en contribuant ainsi à augmenter la coloration liée à ces pigments ils ne seraient plus disponibles pour catalyser l'oxydation des lipides.

La température influence nettement la nature du processus oxydatif mis en jeu. Cette observation est à mettre en relation avec la présence d'une activité POD importante

dans la moutarde. Ainsi, l'analyse comparée de l'activité POD et des pigments hydrosolubles ainsi que liposolubles, dans des moutardes autooxydées à 20 ou à 50°C, montrent qu'à 20°C, sous pression d'oxygène (100 bars), l'activité POD s'exprime pleinement, entraînant la décoloration des β-carotènes, sans formation de mélanoïdines.

En revanche, à 50°C, la formation des produits bruns est importante, le brunissement non enzymatique est accru, comme en témoigne la diminution des composés α-aminés libres. A 50°C et sous pression d'oxygène, la POD semble manifester une activité peroxydatique qui contribuerait également à l'augmentation de la coloration brune de la moutarde, par polycondensation des phénols oxydés. On peut toutefois remarquer que, dans ces conditions, les caroténoïdes, facilement oxydés à 20°C, sont paradoxalement un peu plus protégés à 50°C.

Nous avons également pu mettre en évidence l'importance de la participation de l'oxygène dans l'oxydation des constituants de la moutarde. Ainsi, le composé phénolique révélé en violet par la P.A.N. n'est pas formé sous atmosphère d'azote, à 50°C.

Le rôle bénéfique du dioxyde de soufre, notamment sur l'activité peroxydasique, n'a pas pu être mis en évidence.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mieux comprendre le comportement des sulfites dans un milieu acidifié tel que la moutarde de Dijon.

Une partie y est transformée en SO_2 gazeux, une fraction est oxydée par l'oxygène dissous, tandis qu'une autre réagit avec certains constituants de la moutarde.

L'oxydation induit la formation de radicaux libres oxygénés à partir des sulfites, notamment en présence de cations métalliques. Les formes activées de l'oxygène participent efficacement à la polycondensation oxydative d'une part des composés polyphénoliques et d'autre part des produits issus des réactions entre aminoacides et dérivés carbonylés.

Les radicaux libres secondaires formés peuvent ensuite se polycondenser pour former des produits bruns de la famille des mélanoïdines.

Autre observation intéressante, nous avons pu montrer que l'autooxydation des sulfites pouvait paradoxalement entraîner un accroissement du pouvoir réducteur de la moutarde, ce qui peut éventuellement s'expliquer par le développement d'un processus d'hydroxylation et la formation de substances réductrices à l'égard du ferricyanure de potassium.

Toutefois, on ne saurait écarter en même temps la formation de produits de condensation entre les sulfites résiduels, présents dans le milieu réactionnel, et certains intermédiaires réactifs de la moutarde, tels que les réductones. En effet, il y a tout lieu de penser que les produits de condensation qui en résultent (hydroxysulfonates) possédent un pouvoir réducteur notable (Figure 34).

En revanche, le NADH rajouté en tant que réducteur, incapable de former dans ces conditions des produits de condensation, protège efficacement les constituants de la moutarde contre l'autooxydation.

L'acide ascorbique, quant à lui, est oxydé en acide déhydroascorbique de structure α-dicétonique, capable de se polycondenser ou de réagir avec certains produits d'oxydation de

la moutarde. Les produits de condensation formés sont toutefois beaucoup moins autooxydables que les produits issus de la condensation réductones-SO_2.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que SO_2 est utilisé comme antioxydant en raison de sa capacité d'inhibition du brunissement non enzymatique dans la mesure où il forme, avec les intermédiaires de ces réactions, des dérivés incapables d'être transformés en mélanoïdines.

D'autre part, le rôle des sulfites dans l'inhibition du brunissement enzymatique de la moutarde n'est pas évident ; les résultats obtenus tendent à montrer en effet que l'activité peroxydasique n'est pas modifiée par leur présence, ce qui autorise à penser que leur action inhibitrice s'exerce principalement sur la transformation des produits d'Amadori en mélanoïdines.

Dans ce contexte, il est important de remarquer que les processus d'oxydation, dans la moutarde, varient en fonction de la température.

A 20°C, le brunissement enzymatique est important, comme en témoignent l'activité peroxydasique d'une part et la formation de produits d'oxydation des phénols d'autre part. A cette température, le brunissement non enzymatique se développe en revanche à vitesse plus lente. Il est opportun en même temps de rappeler que l'action inhibitrice du SO_2 s'exerce essentiellement sur les PPO, or, cette activité est pratiquement absente de la pâte de moutarde.

En revanche, pour des températures plus élevées, le brunissement non enzymatique tend à devenir prédominant. A 50°C, il nettement accusé, alors que l'activité POD est loin d'être totalement détruite. Le brunissement, à cette température, dépend à la fois de l'oxydation des dérivés d'Amadori et de l'oxydation des phénols. Il convient en effet d'ajouter que le développement de la pigmentation brune est inexistant dans une moutarde saturée d'azote.

On peut donc penser que le SO_2 exerce une action protectrice à l'égard du brunissement non enzymatique en bloquant les systèmes osoniques et réductoniques.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que certains composés, connus pour leurs propriétés antioxydantes, se sont avérés inefficaces dans la prévention de l'autooxydation de la moutarde.

On sait par ailleurs le rôle que peuvent jouer les constituants phénoliques dans l'inhibition des processus radicalaires, ce qui les fait utiliser comme antioxydants. Toutefois, les constituants phénoliques de la moutarde, présents pourtant en quantité non négligeable, semblent relativement dépourvus de propriétés antioxydantes. On peut supposer cependant qu'ils puissent réagir en synergie avec les composés phénoliques rajoutés (phénols du thé vert ou de romarin), tout en remarquant que certains phénols endogènes sont transformés par autooxydation, comme en témoignent les résultats chromatographiques, après oxydation de la moutarde sous pression d'oxygène. Il convient donc d'être prudent, lors d'une éventuelle addition de composés phénoliques dans un but de protection, et notamment avec les extraits de thé vert dont l'autooxydation peut entraîner directement la formation de produits bruns.

Certains produits d'Amadori incorporant de la cystéine présentent également des propriétés antioxydantes intéressantes. Ils sont cependant moins efficaces que les extraits de thé vert, pour lesquels l'effet optimal est obtenu avec 1,7 µg d'extrait sec de thé par gramme de moutarde.

Nos résultats mettent également en évidence l'importance de la température et surtout de la concentration en oxygène dissous sur les processus d'oxydation de la moutarde. Cette observation est à la fois à corréler avec la manifestation d'une activité POD importante dans la moutarde ainsi qu'avec le développement d'une activité peroxydatique pour des temps de conservation qui dépassent les temps normaux de stockage.

Nous avons pu montrer également que l'activité POD de la moutarde est à l'origine de l'hydroxylation des structures aromatiques, comme en témoignent la formation de composés phénoliques nouveaux à partir de substrats endogènes ainsi que d'aminophénols à partir d'aniline rajoutée comme traceur au système. Cette réaction est essentiellement d'origine enzymatique et se développe rapidement à 20°C.

Nous avons pu enfin mettre en évidence l'importance du rôle des cations métalliques, notamment du fer, dans les mécanismes d'autooxydation de la moutarde. Il est

normal, dans ces conditions, que l'efficacité des antioxydants phénoliques soit beaucoup compromise et se traduise quelquefois par un effet lié à l'établissement de systèmes redox avec O_2 comme accepteur final d'électrons.

Dans ce contexte, il est opportun d'ajouter que le comportement du glutathion , de l'acide ascorbique et des sulfites conduit aux mêmes observations. Il existe néanmoins une ambiguïté sur l'autooxydation des phénols de la moutarde. En effet, nous avons pu mettre en évidence des modifications de structure sans toutefois pouvoir préciser la nature du ou des mécanismes mis en cause. Cependant, la participation de ces constituants notamment en synergie avec ceux du thé vert permet de conclure à l'efficacité inhibitrice d'une telle association pour la protection de la moutarde.

Toutefois, il serait utile de pouvoir approfondir les mécanismes de dégradation oxydatiques mis en jeu, en fonction de la température et du pH, et d'identifier les partenaires en même temps que les produits de ces réactions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDEL RIHMAN A.H.Y., 1985
Flavonoïds of cotton seeds and peanuts as antioxidants.
Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 62 (3), 147-149.

ADAMS J.B., 1991
Review : Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs.
International Journal of Food Science and Technology, 26 (1), 1-20.

AESCHBACH R., PHILLIPOSIAN B., RICHLI U., 1986
Flavonoïdes glycosylés du romarin, leur séparation, isolation et identification.
Bulletin liaison Groupe Polyphénols, 13, 56-58.

AMES B.N., CATHCART R., SCHWIERS E., HOCHSTEIN P., 1981
Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer : a hypothesis.
Proceeding of the National Academy of Science of U.S.A., 78, 6858-6862.

ANDREOLI S.P., MALLETT C.P., BERGSTEIN J.M., 1986
Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 108 (3), 190-198.

AOYAMA M., KANEMATSU H., NIIYA I., TSUKAMOTO M., TOKAIRIN S., MATSUMOTO T., 1991
Studies on the improvement of antioxidant effect of tocopherols. XXII. Synergistic effect of butyl caffeate.
Yukagaku, 40 (3), 202-205.

ARNOLD R.G., 1969
Inhibition of heat-induced browning of milk by L-Cystein.
Journal of Dairy Science, 52 (11), 1857

ASANO K., SHINAGAWA K., HASHIMOTO N., 1982
Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation.
Journal of the American Society of Brewing Chemists, 40 (4), 147-154.

ASQUITH T.N., BUTLER L.G., 1986
Interaction of condensed tannins with selected proteins.
Phytochemistry, 25 (7), 1591-1593.

BAKER G.J., ALLEN D.H., 1982
The spectrum of metabisulphite induced asthmatic reactions : their diagnosis and management.
Australia and New Zealand Journal of Medicine, 12 (2), 213.

BEART J.E., LILLEY T.H., HASLAM E., 1985
Polyphenol Interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during Acid-catalysed decomposition ; Observations on some polymeric proanthocyanidins.
Journal of the Chemical Society Perkin Transaction II, 9, 1439-1443.

BERSET C., TROUILLER J., MARTY C., 1989
Protective effect of the oleoresin of rosmary (*Rosmarinus officinalis* L.) and of several other antioxidants on the β-carotene in extrusion cooking.
Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 22 (1), 15-19.

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G., 1973
New method for quantitative determination of uronic acids.
Analytical Biochemistry, 54, 484-489.

BRADFORD M., 1976
A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein dye binding.
Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

BUDINI R., TONELLI D., GIROTTI S., 1980
Analysis of total phenols using the Prussian blue method.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28 (6), 1236-1238.

CANO P., MARIN M.A., FUSTER C., 1990
Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana (*Musa cavendishii*, var enana).
Journal of the Science of Food and Agriculture, 51 (2), 223-231.

CILLARD J., CILLARD P., 1986
Inhibitors of the prooxidant activity of α-tocopherol.
Journal of the American Oil Chemist's Society, 63 (9), 1165-1169.

CILLARD J., CILLARD P., CORMIER M., GIRRE L., 1980
α-tocopherol prooxidant effect in aqueous media : increased autooxidation rate of linoleic acid.
Journal of the American Oil Chemist's Society, 57 (8), 252-261.

Congressional Hearing on Sulfites, 1985
89th Congress, March 27 1985, Publication 99-3 (Washington DC : U.S. Government Printing Office).

CUVELIER M.E., BERSET C., RICHARD H., 1990
Use of a new test for determining comparative antioxidative activity of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, alpha- and gamma-tocopherols and extracts from rosemary and sage.
Sciences des Aliments, 10 (4), 797-806.

DAVIES K.J.A., SEVANIAN A., MUAKKASAH-KELLY S.F., HOCHSTEIN P., 1986
Uric acid-iron complexes.
Biochemical Journal, 235 (3), 747-754.

DELAVEAU P., VIDAL-TESSIER A., 1986
Propriétés biologiques des quinones.
Bulletin liaison Groupe Polyphénols, 13, 299-308.

DEN DRIJVER L., HOLZAPFEL C.W., VAN DER LINDE H.J., 1986
High-performance liquid chromatographic determination of D-arabino-hexos-2-ulose (D-Gluconose) in irradiated sugar solutions : Application of the method to irradiated mango.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34 (4), 758-762.

DIAHAM B., 1983
Etude des protéines de Brassica juncea au cours de la fabrication et de la conservation de la moutarde.
Thèse Docteur -Ingénieur, Université de Dijon, E.N.S.B.A.N.A.

DIGUISEPPI J., FRIDOVITCH I., 1984
The toxicology of molecular oxygen.
CRC Critical Reviews in Toxicology, 12 (4), 315-342.

DONNELLY J.K., MCLELLAN K.M., WALKER J.L., ROBINSON D.S., 1989
Superoxide dismutases in foods. A review.
Food Chemistry, 33 (4), 243-270.

DUDLEY E.D., HOTCHKISS J.H., 1989
Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase.
Journal of Food Biochemistry, 13 (2), 65-75.

DZIEZAK J.D., 1986
Preservatives : Antioxidants, the ultimate answer to oxidation.
Food Technology, 40 (9), 94-102.

EICHNER K., 1981
Antioxidative effect of Maillard reaction intermediates.
Progress in Food Nutrition and Science, 5 (1-6), 441-451.

ERIKSSON C (Editeur), 1981
Maillard reactions in food.
Progress in Food Nutrition and Science, 5 (1-6).

EVANS J.J., 1990
Cell wall bound and soluble peroxidases in normal and dwarf tomato.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38 (4), 948-951.

FARAG R.S., EL BAROTY G.S., HASSAN M.N.A., 1989
Influence of Maillard reaction products on the butter and cottonseed oil rancidity.
Chemie Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel, 12 (4), 111-118.

FENWICK G.R., HEANEY R.K., MULLIN W.J., 1983
Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants.
CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18 (2), 123-201.

FOURNIER N., VANGHEESDAELE G., 1980
Composition de la fraction glucidique de la *Brassica juncea* et de la moutarde de Dijon.
Revue française des corps gras, 27 (11), 513-519.

FRANZEN K., SINGH R.K., OKOS M.R., 1990
Kinetics of nonenzymatic browning in dried skim milk.
Journal of Food Engineering, 11 (3), 225-239.

FRIIS P., LARSEN P.O., OLSEN C.E., 1977
Base-catalysed Neber-type rearrangement of glucosinolates [1-(β-D-Glucosylthio)-N-(sulphonato-oxy)alkylideneamines].
Journal of the Chemists Society Perkin Transaction I, 661-665.

FRIJTERS J.E.R., GRIFFITHS N.M., MATHER A.M., REYNOLDS J., FENWICK G.R., 1981
Effect of sulphur dioxide on the chemical composition and odour of mustard paste.
Chemical Senses, 6 (1), 33-43.

FUJITANI T., ANDO H., 1981
Oxidative dimerization of tocopherols during the course of thermal oxidation of satured and unsatured triglycerides. 6. Effect of phospholipids on the thermal oxidation of γ-tocopherol.
Yukagaku, 30 (3), 140-144.

FUJIMAKI M., NAMIKI M., KATO H. (Editeurs), 1986
Amino-Carbonyl reactions in food and biological systems.
Developments in Food Science, 13, Elsevier, Amsterdam.

FUKUDA Y., OSAWA T., NAMIKI M., OZAKI T., 1985
Studies on antioxidative substances in sesame seed.
Agricultural and Biologigal Chemistry, 49 (2), 301-306

GANTHAVORN C., NAGEL C.W., POWERS J.R., 1991
Thermal inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase.
Journal of Food Science, 56 (1), 47-49, 79.

GARDNER H.W., 1979
Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and aminoacids : a review.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27 (2), 220-229.

GARDNER H.W., 1975
Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with non enzymic.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23 (2), 129-136.

GASCOYNE P.R., SYMONS M.C.R., MCLAUGHLIN J.A., 1983
Spontaneous eletron transfer in the reaction between methylglyoxal and methylamine.
International Journal of Quantum Chemistry : Quantum Biology Symposium, 10, 123-132.

GASCOYNE P.R., SYMONS M.C.R., MCLAUGHLIN J.A., SZENT-GYORGYI A., 1982
Free radicals produced in the interaction of cysteine with carbonyls of biological relevance.
International Journal of Quantum Chemistry : Quantum Biology Symposium, 9, 137-143.

GHUYSEN L.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H., STROMINGER J.L., 1965
Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* strain Copenhagen. VI. The soluble glycopeptide and its sequential degradation by peptidases.
Biochemistry, 4 (10), 2245-2254.

GIBRIEL A.Y., EL SAHRIGI A.F., KANDIL S.H., EL MANSY H.A. , 1978
Effect of pH, sodium chloride and sucrose on heat-inactivation and reactivation of peroxidases in certain foods.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 29 (3), 261-266.

GOMYO T., HORIKOSHI M., 1976
On the interaction of melanoïdin with metallic ions.
Agricultural and Biological Chemistry, 40 (1), 33-40.

GRAF E., MAHONEY J.R., BRYANT R.G., EATON J.W., 1984
Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site.
Journal of Biological Chemistry, 259 (6), 3620-3624.

GRIVAS S., NYHAMMAR T., OLSSON K., 1986
Isolation and identification of the food mutagens IQ and MeIQx from the heated model system of creatinine, glycine and fructose.
Food Chemistry, 20 (2), 127-136.

GRONOWITZ S., SVENSSON L., OHLSON R., 1978
Studies of some nonenzymatic reactions of progoitrin.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26 (4), 887-890.

GROSCH W., 1989
Aromastoffe aus der Lipidperoxidation.
Fett, 91 (1), 1-6.

HAGERMAN A.E., BUTLER L.G., 1981
The specificity of proanthocyanidin-protein interactions.
Journal of Biological Chemistry, 256 (9), 4494-4497.

HAISMAN D.R., 1974
The effect of sulphur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissus.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 25 (7), 803-810.

HALLIWELL B., 1978
Lignin synthesis : The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by Manganese (II) and phenols.
Planta, 140 (1), 81-88.

HANDWERK R., COLEMAN R., 1988
Approaches to the Citrus browning problem. A review.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36 (1), 231-236.

HAREL S., KANNER J., 1985
Hydrogen peroxyde generation in ground muscle tissues.
Journal of Agricultural and Biological Chemistry, 33 (6), 1186-1188.

HASHIBA H., 1986
Oxidative browning of Amadori compounds-Color formation by iron with Maillard reaction products.
Developments in Food Science, 13, 155-164.

HAYASE F., HIRASHIMA S., OKAMOTO G., KATO H., 1989
Scavenging of active oxygens by melanoidins.
Agricultural and Biological Chemistry, 53 (12), 3383-3385.

HAYASHI T., NAMIKI M., TSUJI K., 1983,
Formation mechanism of the free radical product and its precursor by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid with amino acid.
Agricultural and Biological Chemistry, 47 (9), 1955-1960.

HAYASHI T., MANOU F., NAMIKI M., TSUJI K., 1981
Structure and interrelation of the free radical species and the precursor produced by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid and the amino acid.
Agricultural and Biological Chemistry, 45 (3), 711-716.

HAYASHI T., NAMIKI M., 1981
On the mechanism of free radical formation during browning reaction of sugars with amino compounds.
Agricultural and Biological Chemistry, 45 (4), 933-939.

HAYON E., TREININ A., WILF J., 1972
Electronic spectra, photochemistry, and autoxidation mechanism of the sulfite-bisulfite-pyrosulfite systems. The SO_2^-, SO_3^-, SO_4^-, and SO_5^- radicals.
Journal of the American Chemical Society, 94 (1), 47-57.

HELLWING M., MORSEL J.T., TULSNER M., 1990
Fortschrittsbericht. Lipoxygenasen - ihre Bedeutung in der Lipidchemie.
Nährung, 34 (5), 449-463.

HENNING W., 1982
Schnelle Sinapin-Bestimmung mit Ionen-Paar HPLC aus Speisesenf und Senfsaaten.
Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 175 (5), 345-348

HERRMANN K., 1989
Occurence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoïc acid compounds in foods.
CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28 (4), 315-347.

HIROSE Y., YAMAOKA H., NAKAYAMA M., 1990 a
Oxidation product of (+)-Catechin from lipid peroxidation
Agricultural and Biological Chemistry, 54 (2), 567-569.

HIROSE Y., YAMAOKA H., NAKAYAMA M., 1990 b
Oxidation product of (-)-Epicatechin under radical reaction.
Yukagaku, 39 (11), 967-969.

HOMMA S., AIDA K., FUJIMAKI M., 1986
Chelation of metal with brown pigments in coffee.
Developments in Food Science, 13, 165-172.

INATANI R., NAKATANI M., FUWA H., 1983
Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives.
Agricultural and Biological Chemistry, 47 (3), 521-528.

JACOBS D.D., 1976
Effect of dissolved oxygen on free sulfur dioxide in red wines.
American Journal of Enology and Viticulture, 27 (1), 42-43.

JANOVITZ-KLAPP A.H., RICHARD F.C., GOUPY P.M., NICOLAS J.J.,1990
Inhibition studies on apple polyphenol oxidase.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38 (4), 926-931.

JAYARAMAN K.S., RAMANUJA M.N., 1987
Studies on multiple forms of polyphenoloxidase from some banana cultivars differing in browning rate.
Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 20 (1), 16-18.

JERUMANIS J., VAN HUYNH N., MULKAY P., DEVREUX A., 1980
Oxydation enzymatique de flavonoïdes.
Bulletin liaison Groupe Polyphénol, 9, 189-199.

JEURING H.S., KUPPERS F.J.E.M., 1980
HPLC of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey.
Journal-Association of Official Analytical Chemists, 63 (4), 1215-1218.

JIANG Z., OORAIKUL B., 1989
Reduction of nonenzymatic browning in potato chips and french fries with glucose oxidase.
Journal of Food Processing and Preservation, 13 (3), 175-186.

JOB D., DUNFORD H.B., 1976
Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I.
European Journal of Biochemistry, 66 (3), 607-614.

KACEM B., MATTHEWS R.F., CRANDALL P.G., CORNELL J.A., 1987, a
Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange juice and orange drinks. Effect of amino acids, deaeration, and anaerobic storage.
Journal of Food Science, 52 (6), 1665-1667, 1672.

KACEM B., CORNELL J.A., MARSHALL M.R., SHIREMAN R.B., MATTHEWS R.F., 1987, b
Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange drinks. Effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen.
Journal of Food Science, 52 (6), 1668-1672.

KAHN V., GOLDSHMIDT S., AMIR J., GRANIT R., 1981
Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase.
Journal of Food Science, 46 (3), 756-764.

KANNER J., FISHBEIN J., SHALOM P., HAREL S., BEN-GARA I., 1982
Storage stability of orange juice concentrate packaged aseptically.
Journal of Food Science, 47 (2), 429-431, 436.

KANNER J., KINSELLA J.E., 1983
Lipid deterioration : β-carotene destruction and oxygen evaluation in a system containing lactoperoxidase, hydrogen peroxide and halides.
Lipids, 18 (3), 198-203

KANNER J., MENDEL H., BUDOWSKI P., 1977
Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (Capsicum annum L.) : peroxidase activity.
Journal of Food Science, 42 (6), 1549-1551

KANNER J., SHAPIRA N., 1989
Oxygen- and metal-ion-dependent nonenzymatic browning of grape juice.
ACS Symposium Series 405 : Quality factors of fruits and vegetables, 55-64.

KAWASHIMA K., ITOH H., CHIBATA I., 1981
Antioxidant effect of peptide in combination with sugar on autoxidation of edible oils.
Agricultural and Biological Chemistry, 45 (4), 987-992.

KENNEDY J.F., RIVERA Z.S., WARNER F.P., LLOYD L.L., JUMEL K., 1989
Analysis of carbohydrates and amino acids in aqueous solutions of L-Ascorbic acid and correlation of their role in the nonenzymatic browning of vitamin C.
Journal of Micronutrient Analysis, 6 (1), 1-17.

KENNEDY J.F., WHITE C.A., WARNER F.P., LLOYD L.L., RIVERA Z.S., 1989
The identification and analysis of the oxidation products of L-ascorbic acid by HPLC.
Journal of Micronutrient Analysis, 5 (2), 91-109.

KHAN A.U.., 1978
Actived oxygen : singlet and superoxide anion.
Photochemistry and Photobiology, 28 (4-5), 615-627.

KIKUZAKI H., NAKATANI N., 1989
Structure of a new antioxidative phenolic acid from Oregano (*Origanum vulgare L.*).
Agricultural and Biological Chemistry, 53 (2), 519-524.

KLIBANOV A.M., BERMAN Z., ALBERTI B.N., 1981
Preparative hydroxylation of aromatic compounds catalyzed by peroxidase.
Journal of the American Chemical Society, 103 (7), 6263-6264.

KOPPENOL W.H., 1985
The reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide : evidence against hydroxyl radical formation.
Journal of Free Radicals in Biology and Medicine, 1, 281-285.

KOZLOWSKA H., ROTKIEWICZ D.A., ZADERNOWSKI R., 1983
Phenolic acids in rapessed and mustard.
Journal of the American Oil Chemist's Society, 60 (6), 1119-1123

KRESHECK G.C., ERMAN J.E., 1988
Calorimetric studies of the thermal denaturation of Cytochrome c peroxidase.
Biochemistry, 27 (7), 2490-2496.

KROH L., ZEISE S., WESTPHAL G., MACHOLZ R., 1989
Untersuchung zur Maillard-Reaktion. 17. Mitt. Zur Inhibierung der Maillard-Reaktion durch Schwel-Verbindungen.
Nährung, 33 (1), 51-55.

KROYER G.T., KRETSCHMER L., WASHUTTL J., 1989
Antioxidant properties of tea and coffee extracts.
Dans : Agriculture, Food Chemistry and the Consumer. Proceeding of the 5th European Conference on Food Chemistry. Versailles, 27-28 Sept. 1989, 433-437

KRYIER K., SOSULSKI F., HOGGE L., 1982, a
Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30 (2), 330-334.

KRYIER K., SOSULSKI F., HOGGE L., 1982, b
Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30 (2), 334-336.

LAMIKANRA O., 1982
Sulfite-induced oxidation and browning of linolenic acid.
Journal of Food Science, 47 (6), 2025-2027, 2032.

LANGDON T.T., 1987
Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents.
Food Technology, 41 (5), 64-67.

LARSON R.A., HUNT L.L., 1978
Photooxidation of a refined petroleum oil : Inhibition by β-carotene and role of singlet oxygen.
Photochemistry and Photobiology, 28 (4-5), 553-555.

LATTANZIO V., LINSALATA V., PALMIERI S., VAN SUMERE C.F., 1989
The beneficial effect of citric and ascorbic acid on the phenolic browning reaction in stored artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads.
Food Chemistry, 33 (2), 93-106.

LECHNER H., KESZTHELYI G., 1986
Die Senfherstellung.
Ernährung, 10 (3), 168-171.

LEE C. Y., KIME R. W. GAVITT B., 1990
The use of honey in wine making.
American Bee Journal, 130 (8), 535-536.

LEE H.S., NAGY S., 1990, a
Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems.
Journal of Food Processing and Preservation, 14 (3), 171-178.

LEE H.S., NAGY S., 1990, b
Formation of 4-Vinyl Guaiacol in adversely stored orange juice as measured by an improved HPLC method.
Journal of Food Science, 55 (1), 162-163, 166.

LEE H.S., NAGY S., 1988
Quality changes and nonenzymic browning intermediates in grapefruit juice during storage.
Journal of Food Science, 53 (1), 168-172, 180.

LEE K., CLYDESDALE F.M., 1979
Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complexed iron in foods.
Journal of Food science, 44 (2), 549-554.

LI Z.F., SAWAMURA M., KUSUNOSE H., 1989
Role of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in browning of Yuzu juice.
Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 36 (2), 127-131.

LIEBLER D.C., KLING D.S., REED D.J., 1986
Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α-tocopherol. Control of α-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione.
Journal of Biological Chemistry, 261 (26), 12114-12119.

LINDSTROM T.D., AUST S.A., 1984
Studies on Cytochrome P-450-dependent lipid hydroperoxide reduction.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 233 (1), 80-87.

LINGNERT H., ERIKSSON C.E., 1981
Antioxidative effect of Maillard reaction products.
Progress in Food Nutrition and Science, 5 (1-6), 453-466.

LÖSCHNER J., KROH L., VOGEL J., 1990
L-Ascorbic acid - A carbonyl component of non-enzymatic browning reactions. Browning of L-ascorbic acid in aqueous model system.
Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 191 (4-5), 302-305.

LYNCH S.C., GRUENWEDEL D.W., RUSSEL G.F., 1983
Mutagenic activity of a nitrosated early Maillard product : DNA synthesis (DNA repair) induced in HeLa S3 carcinoma cells by nitrosated 1-(N-L-Tryptophan)-1-deoxy-D-fructose.
Food and Chemical Toxicology, 21 (5), 551-556.

McEVILY A., IYENGAR R., OTWELL S., 1991
Sulfite alternative prevents shrimp melanosis.
Food Technology, 45 (9), 80, 82-86.

McLEOD A., PANESAR S.S., GIL V.,1987
Thermal degradation of glucosinolates.
Phytochemistry, 20 (5), 977-980.

McMANUS J.P., DAVIS K.G., BEART J.E., GAFFNEY S.H., LILLEY T.H., 1985
Polyphenol Interactions. Part 1. Introduction ; Some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides.
Journal of the Chemical Society Perkin Transaction II, 9, 1429-1438.

McNEIL C.J., BANFORD J.C., BROWN D.H., SMITH W.E., 1981
A relationship between thiols and the superoxide ion.
FEBS Letters, 133, 175-177.

McWEENY D.J., 1981
Sulfur dioxide and the Maillard reaction in food.
Progress in Food Nutrition and Science, 5 (1-6), 395-404

McWEENY D.J., KNOWLES M.E., HEARNE J.F., 1974
The chemistry of non-enzymic browning in foods and its control by sulphites.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 25 (??), 735-746.

MÄDER M., AMBERG-FISHER V., 1982
Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. 1. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases.
Plant Physiology, 70, 1128-1131.

MÄDER M., SCHLOSS P., AMBERG-FISHER V., 1981
H_2O_2-Formation by NADH-oxidation : a method for H_2O_2-measurement and determination of stoichiometry.
Plant Science Letters, 23 (2), 63-69.

MAHONEY JR J.R., GRAF E., 1986
Role of α-tocopherol-Ascorbic acid, Citric acid and EDTA as oxidants in model systems.
Journal of Food Science, 51 (5), 1293-1296.

MAYER A.M., 1987
Polyphenol oxidases in plants. Recent progress.
Phytochemistry, 26 (1), 11-20.

METCALFE L.D., WANG C.N., 1981
Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base catalyzed transesterification.
Journal of Chromatographic Science, 19 (10), 530-535.

MILLIE B.L., PILETIE M.V., 1984
The mechanism of pyrrole, pyrazine and pyridine formation in non-enzymatic browning reaction.
Food Chemistry, 13 (3), 165-180.

MILLER E., SCHREIER P., 1985
Studies on flavonol degradation by peroxidase (Donor : H_2O_2-oxidoreductase, E.C. 1.11.1.7). Part 1. Kaempferol.
Food Chemistry, 17 (2), 143-154.

MONNIER V.M., CERAMI A., 1983
Non enzymatic glycosylation and browning of proteins in vivo.
ACS Symposium Series, 215 : The Maillard Reaction in Foods and Nutrition, 431-449.

MONTGOMERY M.W.,1983
Cystein as an inhibitor of browning in pear juice concentrate.
Journal of Food Science, 48 (3), 951-952.

MÖRSEL J.T., 1990
Fortschrittsbericht Lipidperoxydation 1. Mitt. Primärreaktionen.
Nährung, 34 (1), 3-12.

MÖRSEL J.T., 1990
Fortschrittsbericht Lipidperoxydation 2. Mitt. Sekundäre Reaktionen..
Nährung, 34 (1), 13-27.

MOULDING P.H., GOODFELLOW J., MCLELLAN K.M., ROBINSON D.S., 1989
The occurence of isoperoxidases in conference pears.
International Journal of Food Science and Technology , 24 (3), 269-275.

NAIM M., STRIEM B.J., KANNER J., PELEG H., 1988
Potential of ferulic acid as a precursor to off-favors in stored orange juice.
Journal of Food Science, 53 (2), 500-503,508.

NAKANO M. SUGIOKA K., NAKAMURA T., OKI T., 1980
Interaction between an organic hydroperoxyde and an unsaturated phospholipid and α-tocopherol in model membranes.
Biochimica et Biophysica Acta, 619 (2), 274-286.

NAKATANI N., KIKUZAKI H., 1987
A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare L.*).
Agricultural and Biological Chemistry, 51 (10), 2727-2732.

NAMIKI, 1990
Antioxidants/antimutagens in food.
CRC Critical Review in Food Science and Nutrition, 29 (4), 273-300.

NAMIKI ET HAYASHI, 1981
Formation of novel free radical products in an early stage of Maillard reaction.
Progress in Food Nutrition and Science, 5 (1-6), 81-91.

NIINOMI A., MORIMOTO M., SHIMIZU S., 1987
Lipid peroxidation by the [Peroxidase/H_2O_2/Phenolic] system.
Plant Cell Physiology, 28 (4), 731-734.

NISHIMURA K., OHTSURU M., NOGOTA K., 1989
Effect of ascorbic acid and dehydroascorbic acid on ovalbumin.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37 (6), 1544-1547.

O' BRIEN J., MORRISSEY P.A., 1989
Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28 (3), 211-248.

OBRETONOV T. D., KUNTCHEVA M. J.,1990
Influence of the reaction conditions on the formation of nondialysable melanoïdines from D-glucose and L-amino acids.
Journal of Food Processing and Preservation, 14 (4), 309-324.

OH H.I., HOFF J.E., AMSTRONG G.S., HAFF L.A., 1980
Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28 (2), 394-398.

OMURA H., JAHAN N., SHINOHARA K., MURAKAMI H., 1983
Formation of mutagens by the Maillard reaction.
ACS Symposium Series 215 : The Maillard Reaction in Foods and Nutrition, 537-563.

OSAWA T., 1989;
Analysis and structure elucidation of natural antioxidants.
Yukagaku, 38 (10), 839-847.

OSAWA T., RAMARATHNAM N., KAWAKISHI S., NAMIKI M., TASHIRO T., 1985
Antioxidative defense systems in rice hull against damage caused by oxygen radicals.
Agricultural and Biological Chemistry, 49 (10), 3085-3087.

OSZMIANSKI J., LEE C.Y., 1990
Inhibition of polyphenol oxidase and browning by honey.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38 (10),1892-1895.

OZAWA T., KWAN T., 1986
ESR studies on the reactions of the sulphite radical anion, $SO_3^{-\circ}$, with olefinic compounds in aqueous solutions.
Polyhedron, 5 (10), 1531-1536.

OZO O.Z., CAYGILL J.C., 1986
O-dihydroxyphenoloxidase action on natural polyhydric phenolics and enzymic browning of edible yams.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 37 (3), 283-288.

PERKIN A.G., 1982
Chemiluminescent determination of hydrogen peroxide in water.
Journal of the Society of Dairy Technology, 35 (4), 147-148.

PIZZACORO F., CAFFA F., GASPAROLI A., FEDELI E., 1985
Capacità antiossidante di alcune erbe aromatiche sul muscolo e sull'olio di sardina.
Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 62 (7), 351-356.

POKORNY J., DAVIDEK J., KMINEK M., PARIZKOVA H., 1989
Décomposition thermique de l'hydroperoxyde d'oléate de butyle. 5. Décomposition d'hydroperoxydes en présence de tocophérol et de métaux lourds.
Revue Française des Corps Gras, 36 (2), 59-63.

POKORNY, 1981
Browning from lipid-protein interactions
Progress in food nutrition and science, 5 (1-6), 421-428.

PYYSALO T., TOKKELI H., HONKANEN E., 1977
The thermal decarboxylation of some substituted cinnamic acids.
Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 10 (3), 145-147.

RABEK J.F., RANBY B., 1978
The role of singlet oxygen in the photooxidation of polymers.
Photochemistry and Photobiology, 28 (4-5), 557-570.

RAMANUJA M.N., VIBHAKARA H.S., JAYARAMAN K.S., 1988
Studies on the occurence, partial purification and effect of heating on peroxidase in some vegetables.
Journal of Food Science and Technology (Mysore), 25 (4), 201-204.

RAMARATHNAM N., OSAWA T., NAMIKI M., KAWAKISHI S., 1989
Chemical studies on novel rice hull antioxidants. II. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37 (2), 316-319.

RAMASWAMY H.S., RANGANNA S., 1989
Residual peroxidase activity as influenced by blanching, SO_2 treatment and freezing of cauliflowers.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 47 (3), 376-381.

RAO A.M., 1982
Hydrogen bonding interaction of α-tocopherol.
Current Science, 51 (5), 234-235.

REINTON R., ROGSTAD A.,1981
Antioxidant activity of tocopherols and ascorbic acid.
Journal of Food Science, 46 (3), 970-971, 973.

REUTIMANN U., BILL R., DÜRR P. , SCHOBINGER U., 1991
Ersatz von SO_2 durch 5,6-Sulfinyl-L-Ascorbinsäure bei der Weinbereitung.
Mitteilungen Klosterneuburg, 41 (2), 65-70.

RICHARD F., NICOLAS J., 1989
Purification of apple peel peroxidase studies of some properties and specificity in relation to phenolic compounds.
Sciences des Aliments, 9 (2), 335-350.

RICHARD C., 1986
Inhibition de l'oxydation induite du linoléate de méthyle par des dérivés phénoliques ou par les vitamines E ou C : effets de synergie de la vitamine C ou de composés aminés sur les propriétés inhibitrices de la vitamine E.
Thèse Université de Nancy I.

ROBAK J., GRYGLEWSKI R.J., 1988
Flavonoïds are scavengers of superoxide anions.
Biochemical Pharmacology, 37 (5), 837-841.

ROSTEIN S., 1982
Contribution à l'étude des constituants phénoliques et des activités oxydasiques dans la graine et la pâte de moutarde.
D.E.A. Université Nancy I, U.E.R. Alimentation Nutrition.

ROUSSEAU C., RICHARD C., MARTIN R., 1988
Synergy effects of glutathione and amino acids on the antioxidant efficiency of vitamins C and E in the induced oxidation of methyl linoleate.
Journal de Chimie Physique et de Physicochimie Biologique, 85 (1), 145-146.

SAL'KOVA E.G., AMZASHVILI M.G., 1987
Antioxidant activity of extracts of apple cuticle.
Prikladnaya Biokkhimiya i Mikrobiologiya, 23 (5), 686-691.

SANADA H., SUZUE E., NAKASHIMA Y., KAWADA S., 1972
Effect of thiol compounds on melanin formation by tyrosinase.
Biochimica et Biophysica acta, 261, 258-266.

SANKARAN L., NARASHIMA RAO P.L., 1977
Sodium bisulphite addition compounds of benzyl isothiocyanates : Evidence for their structure as sodium benzylaminothiomethanesulphonates.
Indian Journal of Chemistry, 15B (4), 386-387.

SANTERRE C.R., CASH J.N., VAN NORMAN D.J., 1988
Ascorbic acid/Citric acid combinations in the processing of frozen apple slices.
Journal of Food Science, 53 (6), 1713-1716, 1736.

SAPERS G.M., HICKS K.B., 1989
Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables.
ACS Symposium Series 405 : Quality factors of fruits and vegetables, 29-43.

SAUVAGEOT F., FARES K., MOUNIE J., 1985
Effet du SO_2 sur le caractère piquant d'une moutarde forte de Dijon .
Sciences des aliments, 5 (H.S. 5), 79-84.

SAWAMURA M., LI Z.F., TAKEMOTO K., KUSUNOSE H., 1989
Oxygen and temperature dependence on the browning of Yuzu juice.
Nippon Nogeikagaku Kaishi, 65 (1), 45-47.

SAYAVEDRA SOTO, L.A, 1984
Inhibition of polyphenol oxidase by sulfur dioxide.
Thèse Oregon State University. Dans Dissertation Abstracts International, 44 (10), 3029 B.

SCHOBINGER U., DÜRR P., WALDVOGEL R., 1989
Glucoseoxidase zur Verminderung der Sauerstoffbelastung bei Abfüllung von Getränken.
Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung, 39 (6), 251-256.

SCHREIER P., MILLER E., 1985
Studies on flavonol degradation by peroxidase (Donor : H_2O_2-oxidoreductase, E.C. 1.11.1.7). Part 2. Quercetin.
Food Chemistry, 18 (4), 301-317.

SCHULZ J.M., HERRMANN K., 1981
Uber das Vorkommen von p-Hydroxibenzoesäure in Senfsaat.
Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 172 (4), 253-256.

SCHUSTER B., HERRMANN K., 1985
Bildung von Hydroxybenzoesäuren aus Flavonoiden bei enzymatischen und alkalischen Hydrolysen.
Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 181 (6), 467-469.

SLAWINSKA D., 1978
Chemiluminescence and the formation of singlet oxygen in the oxidation of certain polyphenols and quinones.
Photochemistry and Photobiology, 28 (4-5), 453-458.

STENGEL B., GEIGER H., 1976
Kämpferol-3-(O-sinapoylsophorosid)-7-glucosid, ein neues Flavonoid aus *Brassica napus* L. (Cruciferae).
Zeitschrift für Naturforschung, 31C, 622-623.

SUYAMA K., ADACHI S., 1986
Quaternary pyridinium salts formed by aminocarbonyl reaction and their thermal elimination reaction involving carbocation formation.
Developments in Food Science, 13, 95-103.

SUZUKI T., USUKI R., KANEDA T., 1989
The role of carotenoids in the oxidative deterioration of edible oils.
Yukagaku, 38 (6), 486-491.

SVENSSON B.E., 1988
Thiols as myeloperoxidase-oxidase substates.
Biochemical Journal, 253 (2), 441-449.

SVINGEN B.A., O'NEAL F.O., AUST S.D., 1978
The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation.
Photochemistry and Photobiology, 28 (4-5), 803-809.

TAKEUCHI W., TAKAHASHI H., KOJIMA M., 1989
Non-enzymatic hydroxylation of (E)-p-coumaric acid to (E)-caffeic acid.
Agricultural and Biological Chemistry, 53 (8), 2267-2268.

TAMURA T., TAKEDA M., MURAKAMI K., YOSHIDA A., MATSUMOTO T., 1962
On some ferulates.
Yukagaku, 11 (9), 454-458.

TAMURA Y., MORITA Y., 1975
Thermal denaturation and regeneration of japanese-radish peroxidase.
Journal of Biochemistry, 78 (3), 561-571.

TANAKA M. KUEI C.W., NAGASHIMA Y., TAGUCHI T., 1988
Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products.
Nippon Suisan Gakkaishi, 54 (8), 1409-1414.

TANAKA T., TAKEUCHI M., ICHISHIMA E., 1989
Inhibition study of tyrosinase from *Aspergillus oryzae*.
Agricultural and Biological Chemistry, 53 (2), 557-558.

TANIZAWA H., TODA S., SAZUKA Y., TANIYAMA T., HAYASHI T., ARICHI S., TAKINO Y., 1984
Natural antioxidants. 1. Antioxidative components of tea leaf (*Thea sinensis* L.)
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 32 (5), 2011-2014.

TANTAWY B., TOLLIER M.T., ROBIN J.P., 1986
Caractérisation de deux glycosides acylés du Kaempférol dans les graines de colza (*Brassica napus*)
Bulletin liaison Groupe Polyphénols, 13, 68-70.

TAOUKIS P.S., LABUZA T.P., LIN S.W., LILLEMO J.H., 1988
Inhibition of enzymic browning.
PCT Int. Appl. WO 89 11 227 (Cl A23L3/34), 30 Nov. 1989. US Appl. 197038, 20 May 1988, 23 pages.

TAYLOR S.L., HIGLEY N.A., BUSH R.K., 1986
Sulfites in foods : uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity and hypersensitivity.
Advances in Food Research, 30 (1), 1-76.

TERAO J., MATSUSHITA S., 1981
The isomeric compositions of hydroperoxides produced by oxidation of arachidonic acid with singlet oxygen.
Agricultural and Biological Chemistry, 45 (3), 587-593.

THANARAJ S.N.S., SESHADRI R., 1990
Influence of polyphenol oxidase activity and polyphenol content of tea shoot on quality of black tea.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 51 (1), 57-69.

TOIGUCHI S., HAYASHI K., ADACHI Y., MOTOKI M., HARAGUCHI K., 1989
Purification and characterisation of soybean oxidase.
Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 36 (7), 597-602.

TONO T., FUJITA S., LI Z.F., 1989
Assay of o-diphenol oxidizing activity in japanese pear polyphenol oxidase by difference spectra spectrophotometry.
Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 36 (11), 920-923.

TOUSSAINT O., LERCH K., 1987
Catalytic oxidation of 2-aminophenols and ortho hydroxylation of aromatic amines by tyrosinase.
Biochemistry, 26 (26), 8567-8571.

UEDA S., HAYASHI T., NAMIKI M., 1986
Effect of ascorbic acid on lipid autoxidation in a model food system.
Agricultural and Biological Chemistry, 50 (1), 1-7.

URASHIMA T., SUYAMA K., ADACHI S., 1988
The condensation of 5-(hydroxymethyl)-2-furfuraldehyde with some aldoses on heating.
Food Chemistry, 29 (4), 7-17.

VAMOS-VIGYAZO L., 1981
Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables.
CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 15 (1), 49-127.

VANGHEESDAELE G., FOURNIER N., 1980
Composition chimique de la Brassica juncea utilisée dans la fabrication de la moutarde de Dijon.
Revue française des corps gras, 27 (1), 15-22.

VANGHEESDAELE G., FOURNIER N., 1977
Origine et rôle du cuivre et du fer dans la fabrication de la moutarde de Dijon.
Annales de Technologie Agricole, 26(4), 487-498.

VANLELYVELD L.J., GERRISH C., DIXON R.A., 1984
Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discoloration of avocado fruit.
Phytochemistry, 23 (8), 1531-1534.

WALKER J.R.L., REDDISH C.E.S.,1964
Note on the use of cysteine to prevent browning in apple products.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 15, 902-904.

WALKER R., 1985
Sulphiting agents in foods : some risk/benefit considerations.
Food Additives and Contaminants, 2 (1), 5-24.

WALLER G.R., FEATHER M.S. (Editeurs), 1983
The maillard reaction in foods and nutrition.
ACS Symposium Series, 215.

WEDZICHA B.L., GARNER D.N., 1991
The formation and reactivity of osuloses in the sulphite-inhibited Mailard reaction of glucose and glycine.
Food Chemistry, 39 (1), 73-86.

WEDZICHA B.L., 1986
Interactions involving sulphur dioxide in foods.
dans : Interactions of Food Components. Ed. BIRCH, LINDLEY. Elsevier Publishers, 99-116.

WEDZICHA B.L., LAMIKANRA O., HERRERA J.C., PANAHI S., 1984
Recent developments in the understanding of the chemistry of sulphur (IV) oxospecies in dehydrated vegetables.
Food Chemistry, 15 (2), 141-155.

WEDZICHA B.L., VAKALIS N., 1988
Kinetics of the sulphite-inhibited Maillard reaction : the effect of sulphite ion.
Food Chemistry, 27 (4), 259-271.

WEDZICHA, 1981
Sulphur dioxide.
Nutrition and Food Science, (5), 12-16,19.

WELLER P.E., MARKEY C.M., MARNETT L.J., 1985
Enzymatic reduction of 5-Phenyl-4-pentenyl-hydroperoxide : detection of peroxidases and identification of peroxidase reducing substances.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 243 (2), 633-643.

WILLIAMSON G., 1989
Purification of glutathione-S-transferase from lamb muscle and its effect on lipid peroxidation.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 48 (3), 347-360.

WISE R.R., NAYLOR A.W., 1987
Chilling-enhanced photooxidation : evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants.
Plant Physiology, 83 (2), 278-282.

YAMAGUCHI N., 1986
Antioxidative activity of the oxidation products prepared from melanoidins.
Developments in Food Science, 13, 291-299.

YAMAGUCHI N., KOYAMA Y., FUJIMAKI M., 1981
Fractionation and antioxidative activity of browning reaction products between D-xylose and glycine.
Progress in Food Nutrition and Science, 5 (1-6), 429-439.

YAMAGUCHI T., 1980
A sensitive and simple method for the determination of fatty acid hydroperoxides with horseradish peroxidase.
Agricultural and Biological Chemistry, 44 (11), 2747-2748.

YANG S.F., 1984
Reactions of oxidation intermediates of sulphite species with some cellular components of plants.
Food Chemistry, 15 (2), 113-124.

YANG S.F., 1973
Destruction of tryptophan during the aerobic oxidation of sulfite ions.
Environmental Research, 6, 395-402.

YAYLAYAN V., SPORNS P., 1989
Intramolecular cyclizations of Lysine Amadori rearrangement products.
Food Chemistry, 33 (2), 81-91.

YEN G.C., LEE T.C., 1986
Mutagen formation in the reaction of maillard browning products, 2-acetylpyrrole and its analogues, with nitrite.
Food and Chemical Toxicology, 24 (12), 1303-1308.

YOKOTA K., YAMAZAKI I., 1977
Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase.
Biochemistry, 16 (9), 1913-1920.

YOUNIS N., 1984
Etude sur les constituants glucidiques des graines de Brassica juncea. Répartition entre l'amande et la pellicule.
Thèse de Docteur-Ingénieur. Université de Nancy I. U.E.R. Alimentation et Nutrition.

YUAN C.W., MARTY C., RICHARD H., 1989
Formation de pyrazines par réaction de Maillard à partir d'ester éthylique de la glycine et de glycéraldéhyde.
Sciences des aliments, 9 (1), 125-134.

YUAN C.W., RIEUX J., BEAUHAIRE J., FOURREY J.L., RICHARD H., 1989
Mise en évidence d'une dihydro-1,4-pyrazine au cours d'une étude modèle de la réaction de Maillard.
Sciences des aliments, 9 (1), 135-146.

ZIDERMAN I.I., GREGORSKI K.S., LOPEZ S.V., FRIEDMAN M., 1989
Thermal interaction of ascorbic acid and sodium ascorbate with proteins in relation to nonenzymatic browning and Maillard reactions of foods.
Journal of Agricultural and Biological Chemistry, 37 (6), 1480-1486.

ANNEXES

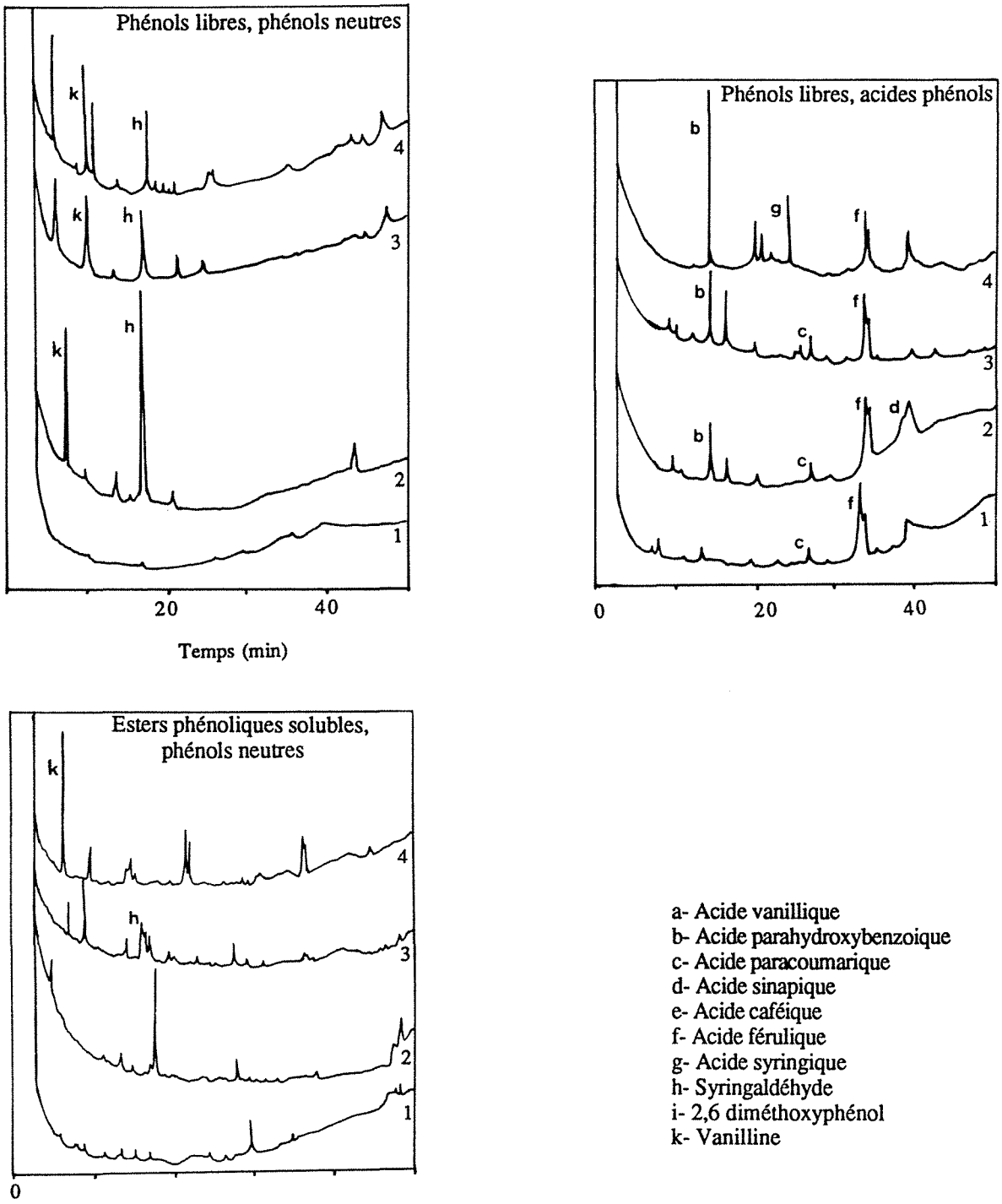
Les différentes fractions phénoliques obtenues à partir de moutarde auto-oxydée sous oxygène pur (100 bars), à 20 ou à 50°C, sont analysées par chromatographie en phase sur colonne capillaire OV1 (cf. Matériel et Méthodes).

L'étude est effectuée sur moutarde fraîche et sur moutarde enrichie en sulfite de sodium à raison de 50 ppm.

Nous présentons dans cette partie les résultats obtenus avec la moutarde enrichie en sulfite, ceux correspondants à la moutarde non sulfitée sont présentés Figures 79, pages 203 à 206.

Les principales modifications observées concernent la fraction "Acides phénoliques libres". A 50°C, comparativement à la moutarde non sulfitée, la quantité de produits d'oxydation formés semble diminuée dans la moutarde enrichie en sulfite.

En revanche, dans les autres fractions, pour une même température, l'addition de sulfite ne semble avoir que peu d'effet sur la composition en phénols.



a- Acide vanillique
b- Acide parahydroxybenzoique
c- Acide paracoumarique
d- Acide sinapique
e- Acide caféique
f- Acide férulique
g- Acide syringique
h- Syringaldéhyde
i- 2,6 diméthoxyphénol
k- Vanilline

Figure 98 : Séparation chromatographique des extraits phénoliques d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

Séparation par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV1

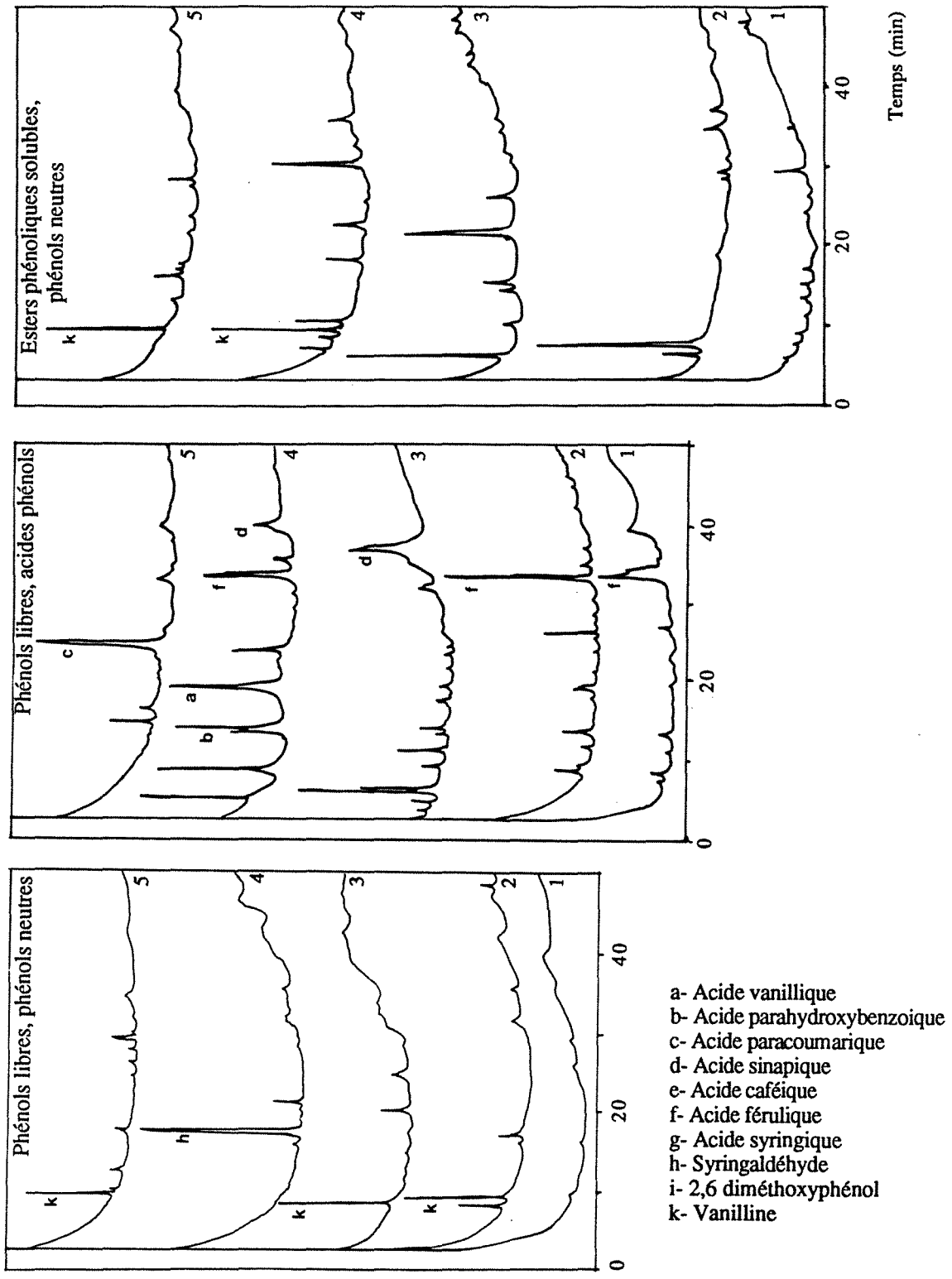


Figure 99 : Séparation chromatographique des extraits phénoliques d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 1 jour
3. Moutarde oxydée pendant 2 jours
4. Moutarde oxydée pendant 4 jours
5. Moutarde oxydée pendant 7 jours

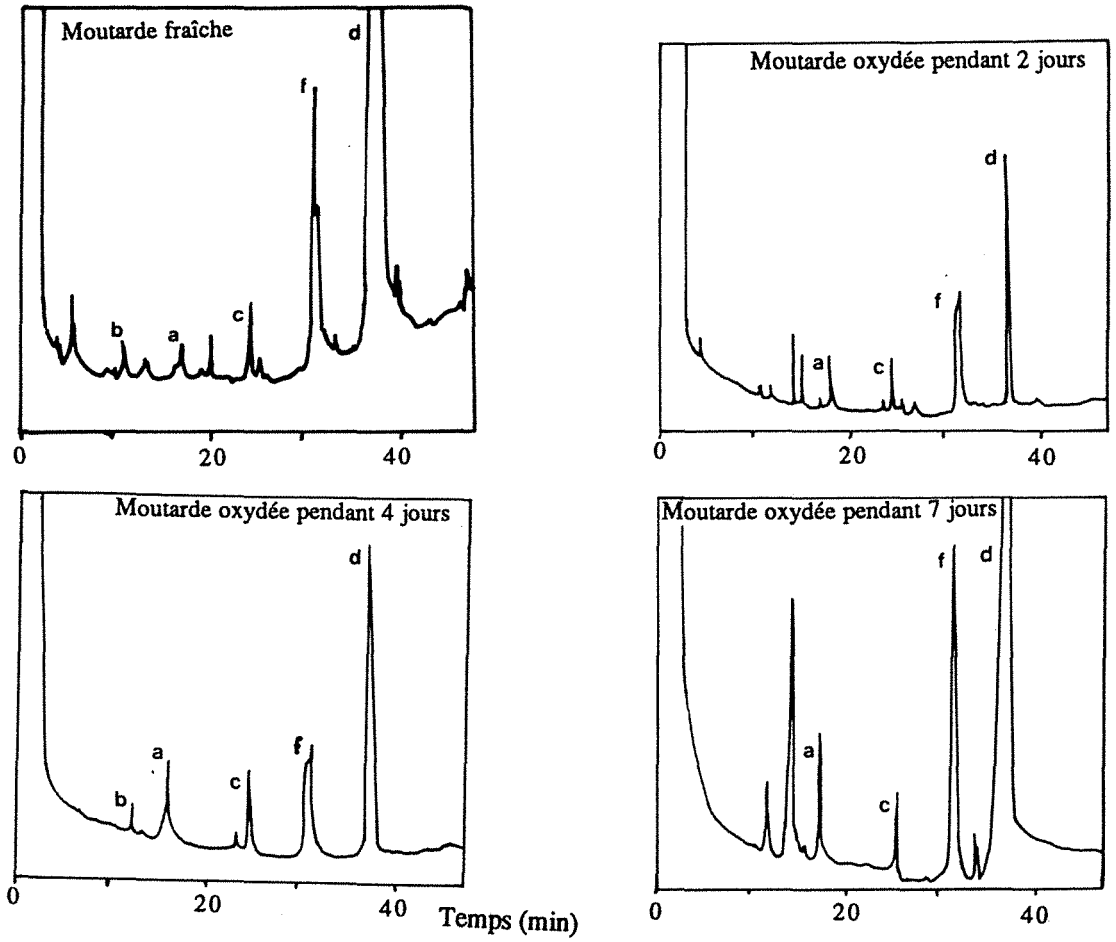


Figure 100 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

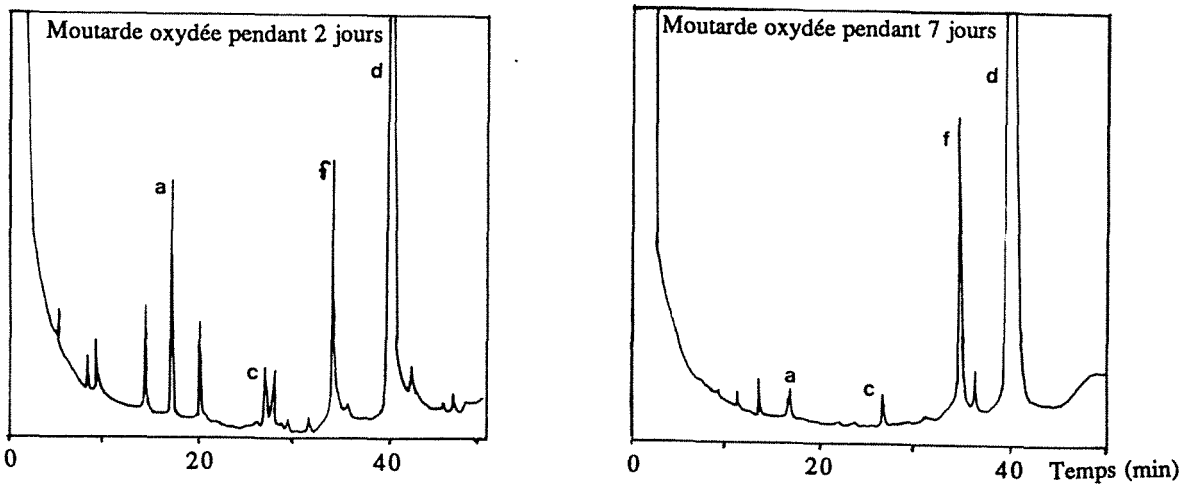
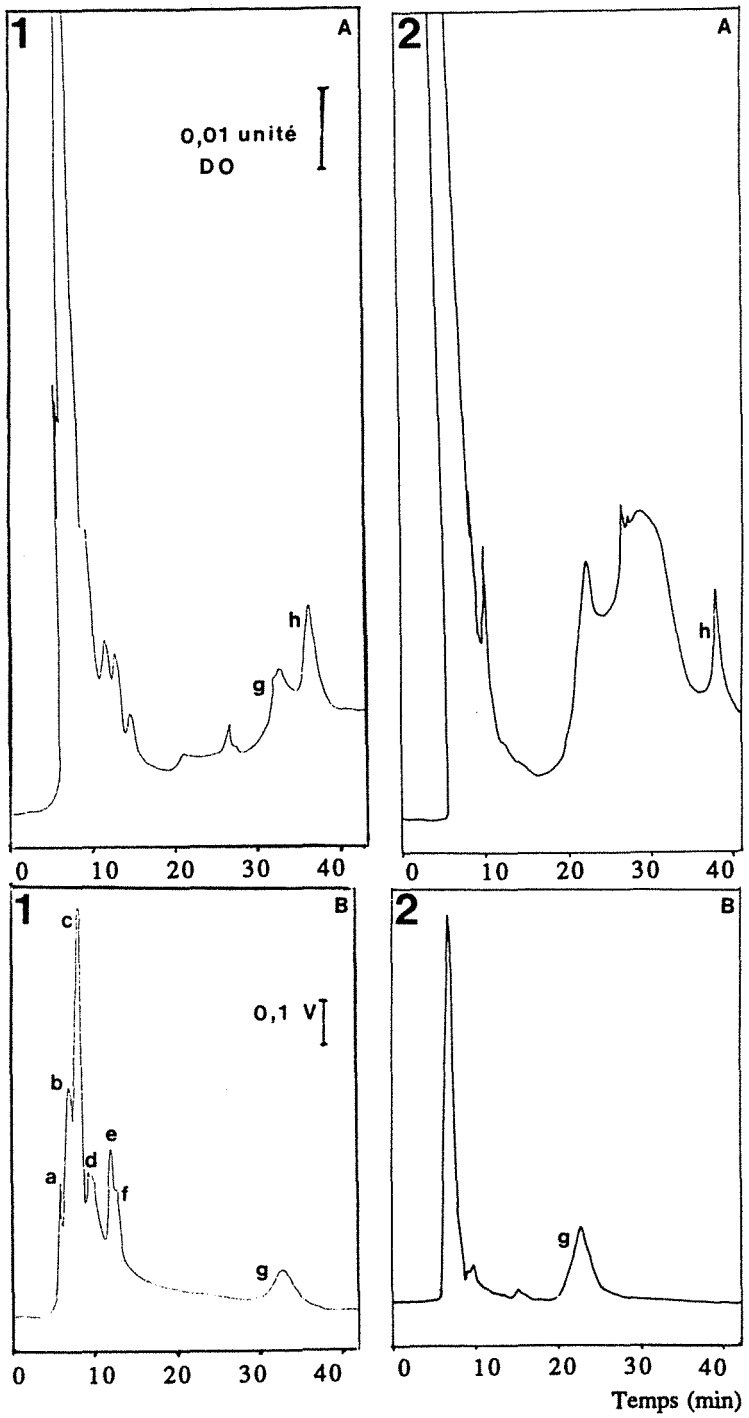


Figure 101 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

Les extraits phénoliques (Ether éthylique/Acétate d'éthyle (1:1, v/v), cf. Matériel et Méthodes) ont été analysées également par chromatographie HPLC, sur colonne C18. L'utilisation d'un détecteur électrochimique réglé à un potentiel oxydant (ddp = 1V) permet d'observer la formation de nouveaux composés notamment lors de l'hydroxylation.



A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours

Séparation sur colonne HPLC C18 5 µm.
Solvant Méthanol/Acide formique 5% (v/v)

Figure 100 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques libres" d'une moutarde auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

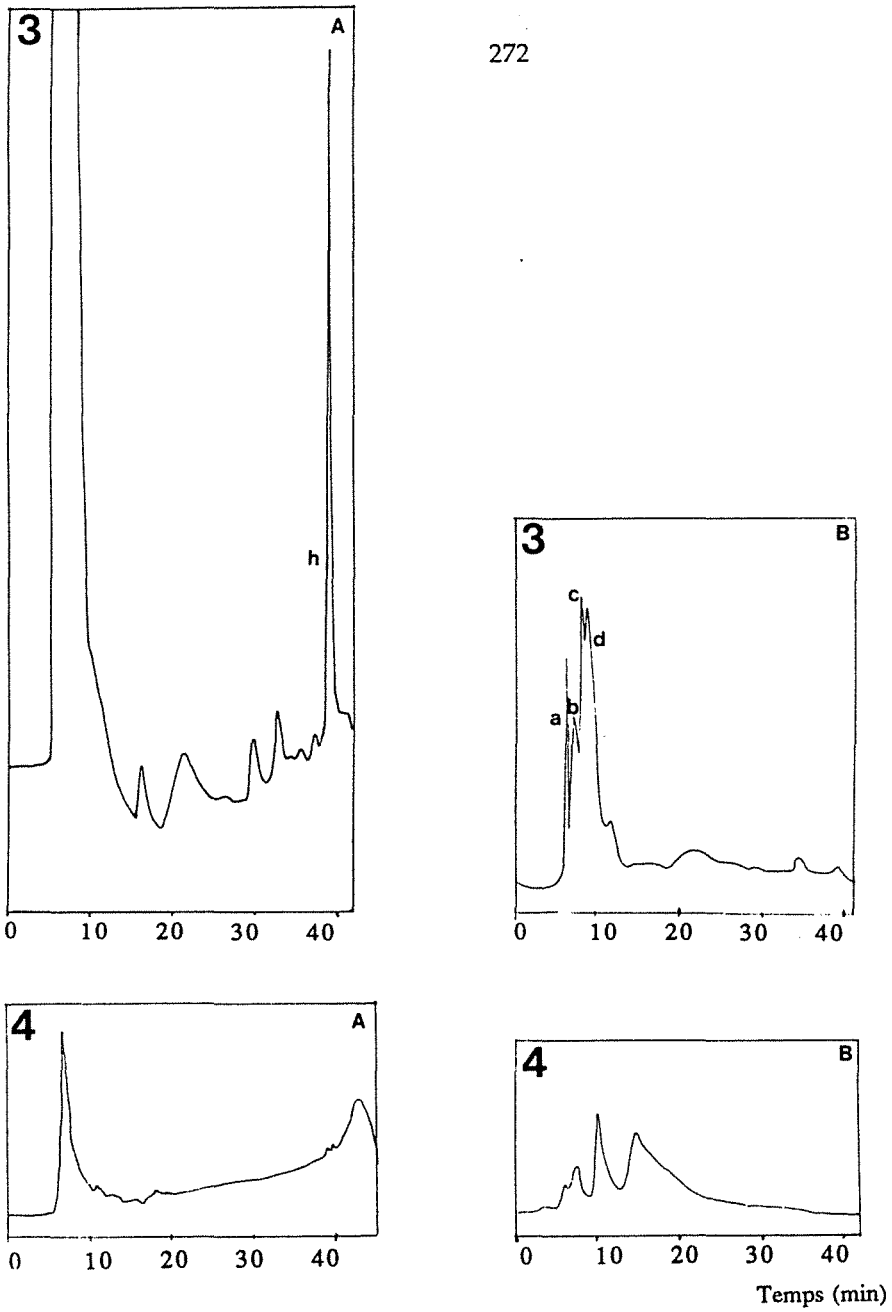


Figure 102 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques libres" d'une moutarde auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

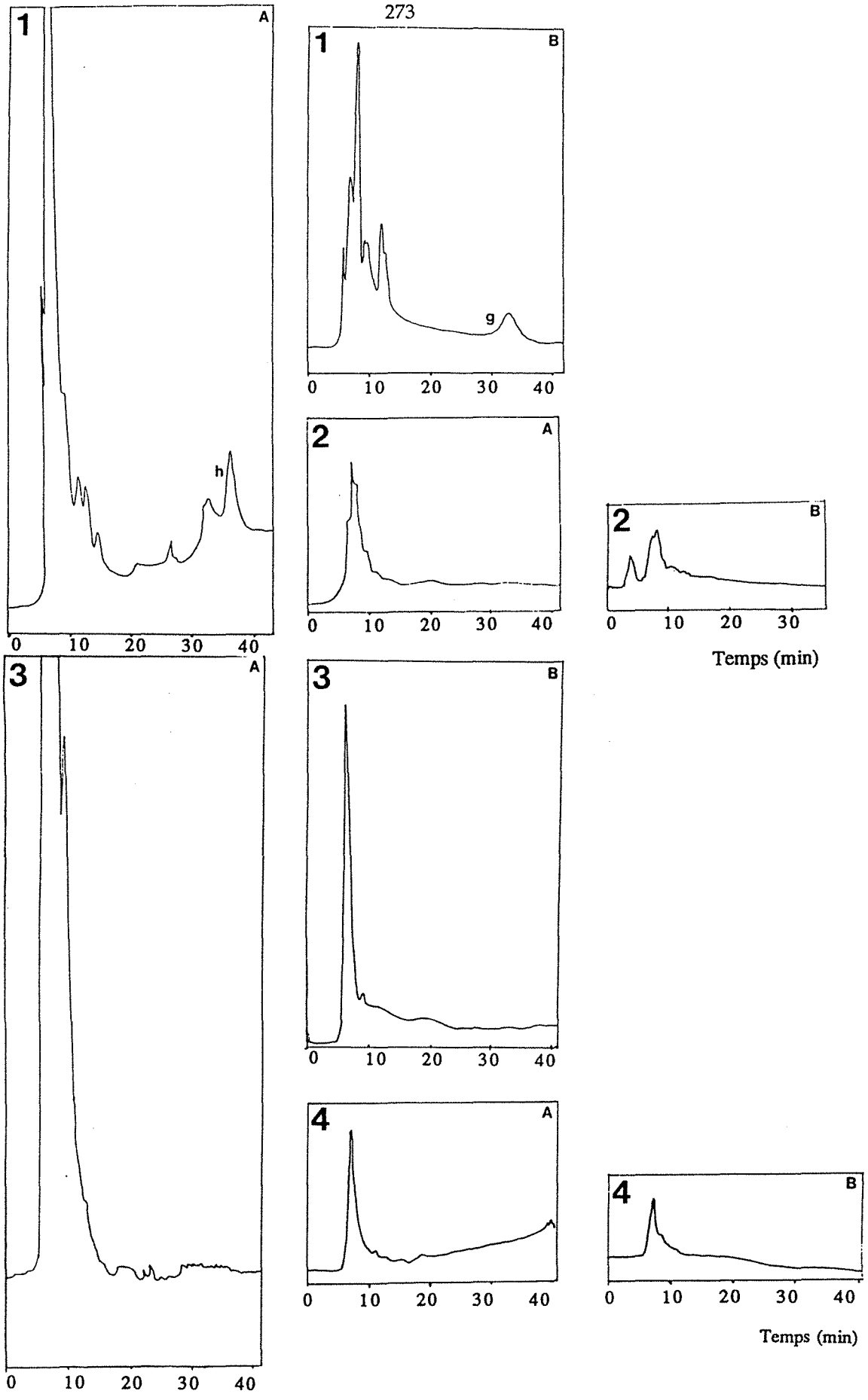

1
A
h
0 10 20 30 40
1
B
g
0 10 20 30 40
2
A
0 10 20 30 40
2
B
0 10 20 30
Temps (min)
3
A
0 10 20 30 40
3
B
0 10 20 30 40
4
A
0 10 20 30 40
4
B
0 10 20 30 40
Temps (min)

Figure 103

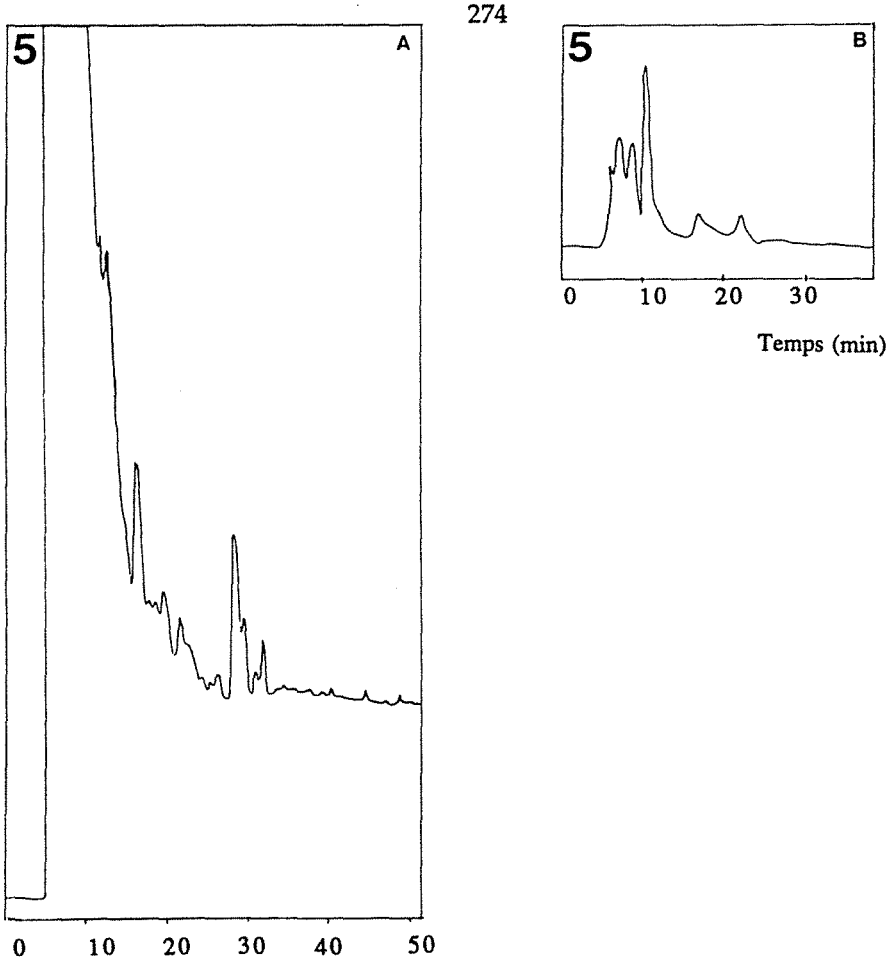


Figure 103: Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques libres" d'une moutarde auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours
5. Moutarde oxydée pendant 15 jours

voir page précédente

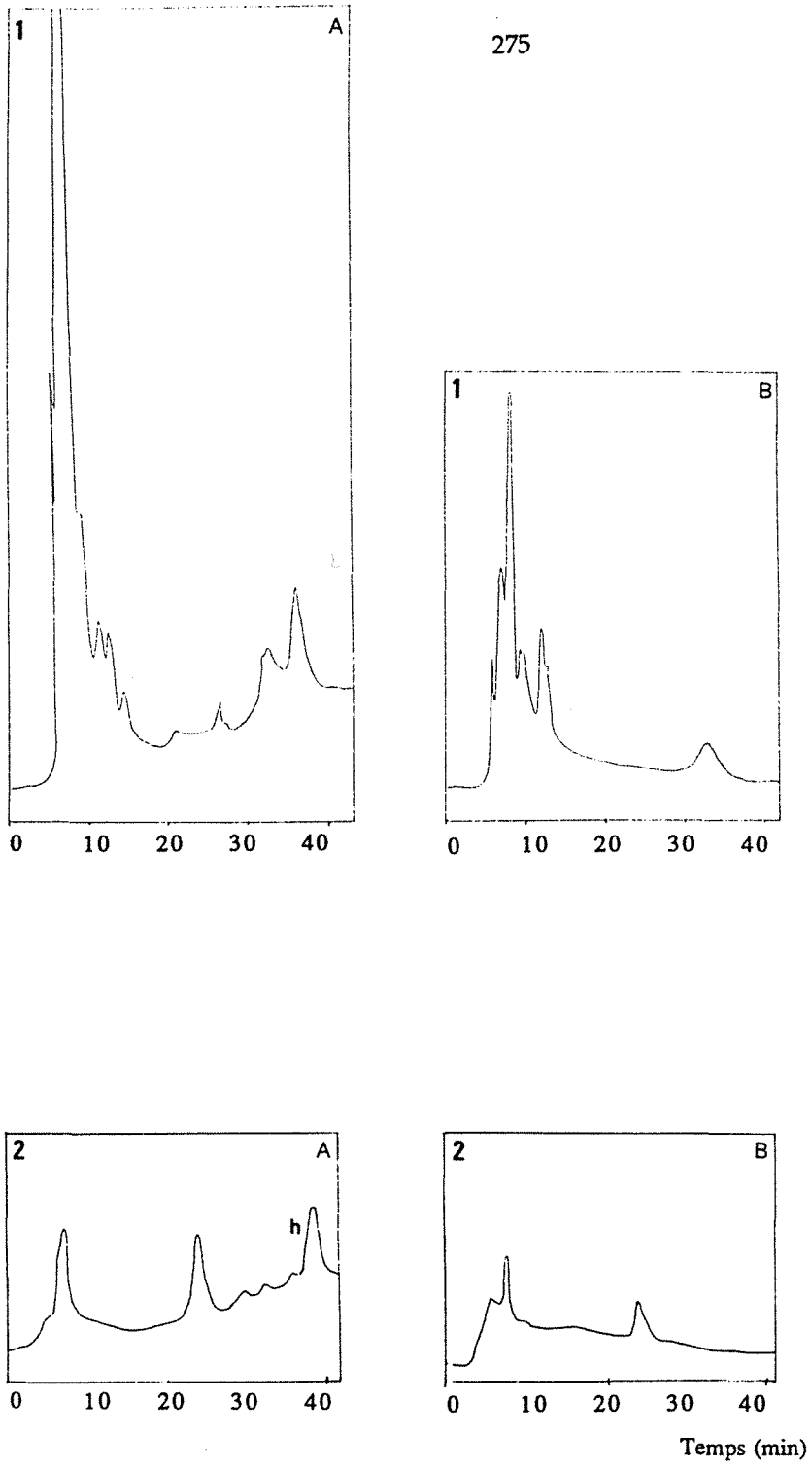


Figure 104 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques libres" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

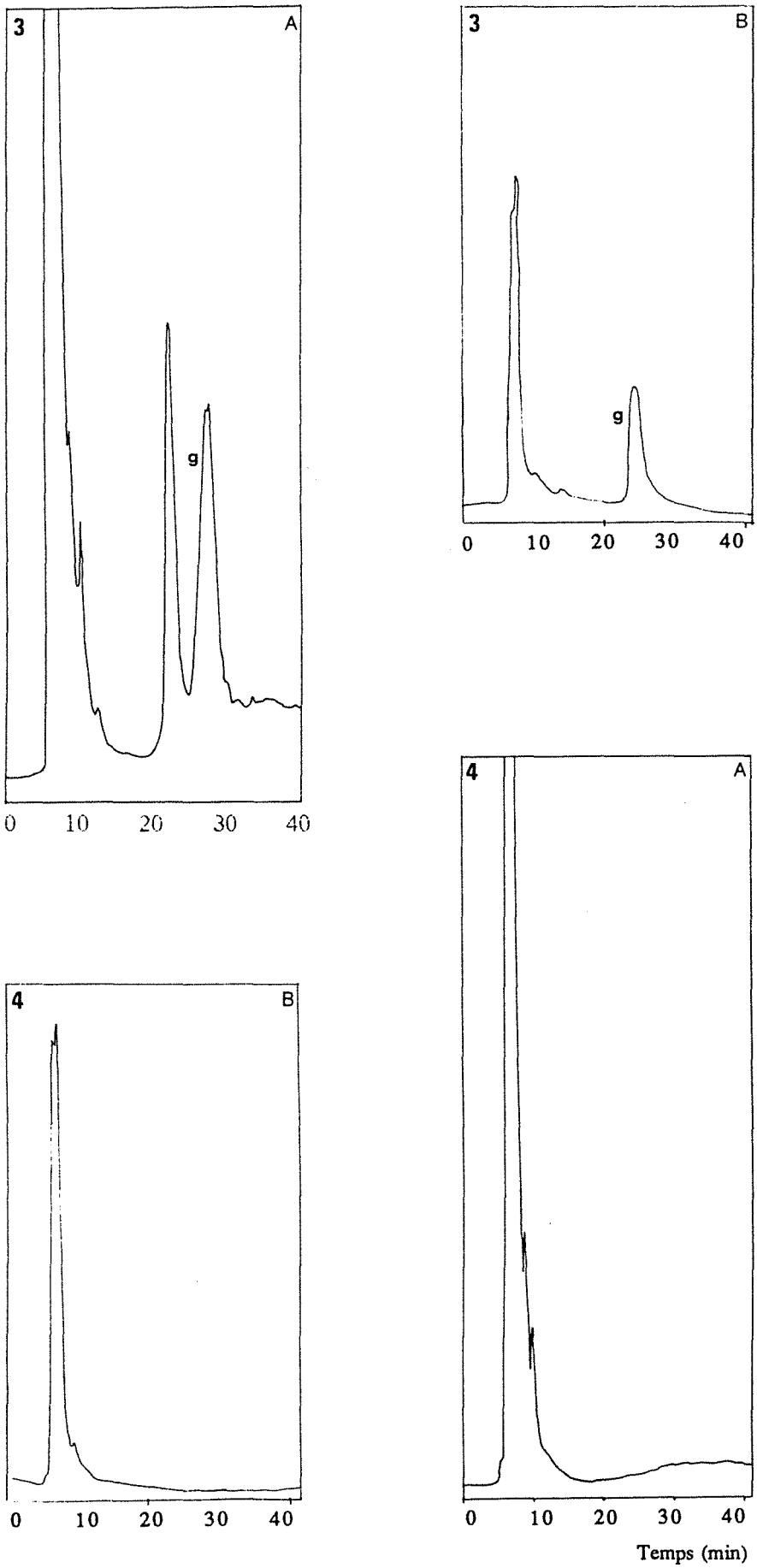

3
A
g
0
10
20
30
40
3
B
g
0
10
20
30
40
4
A
0
10
20
30
40
Temps (min)
4
B
0
10
20
30
40

Figure 104

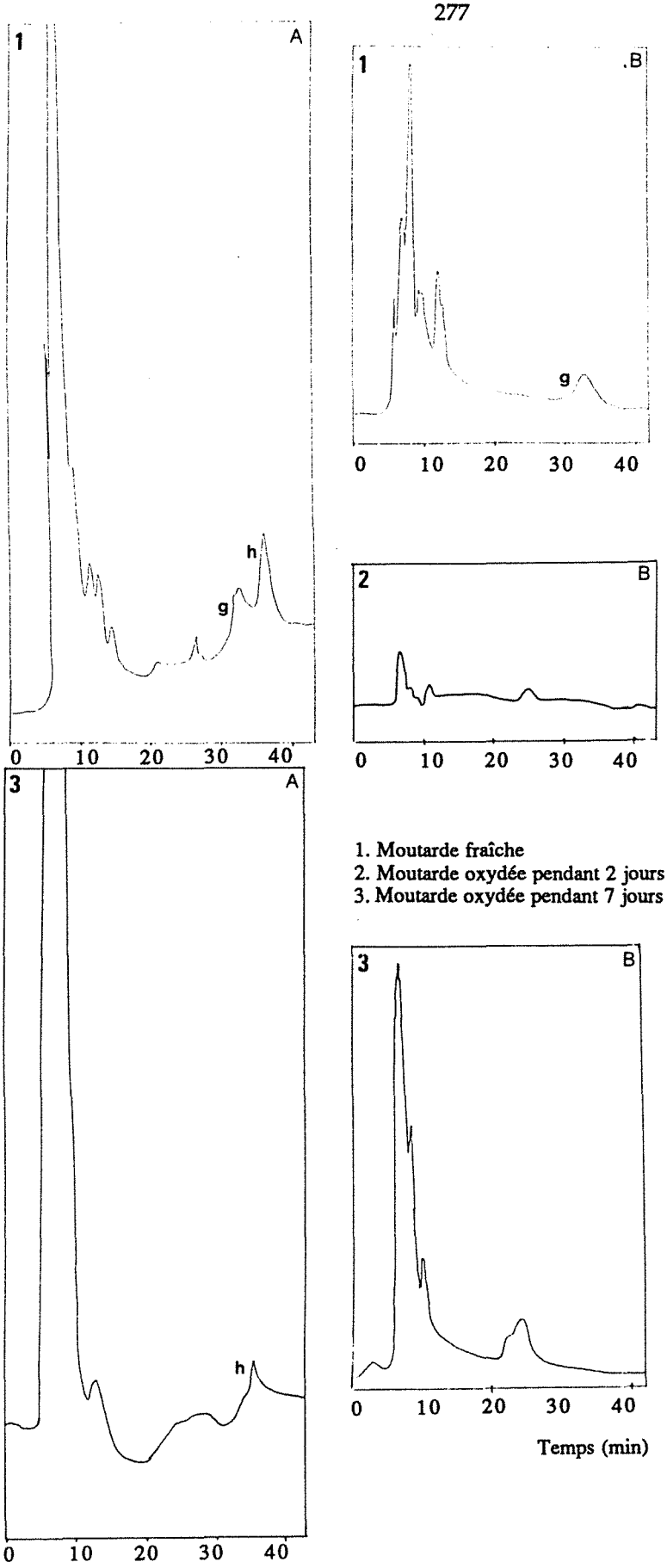


Figure 105 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques libres" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm), puis auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

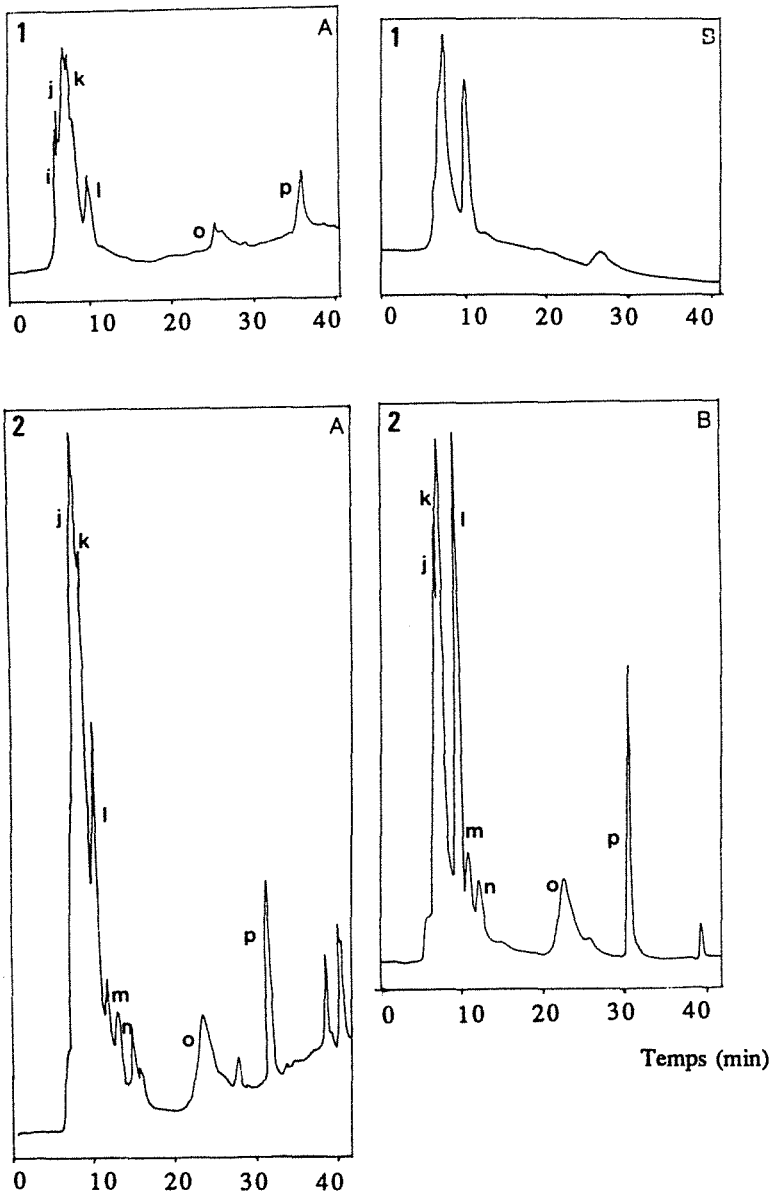
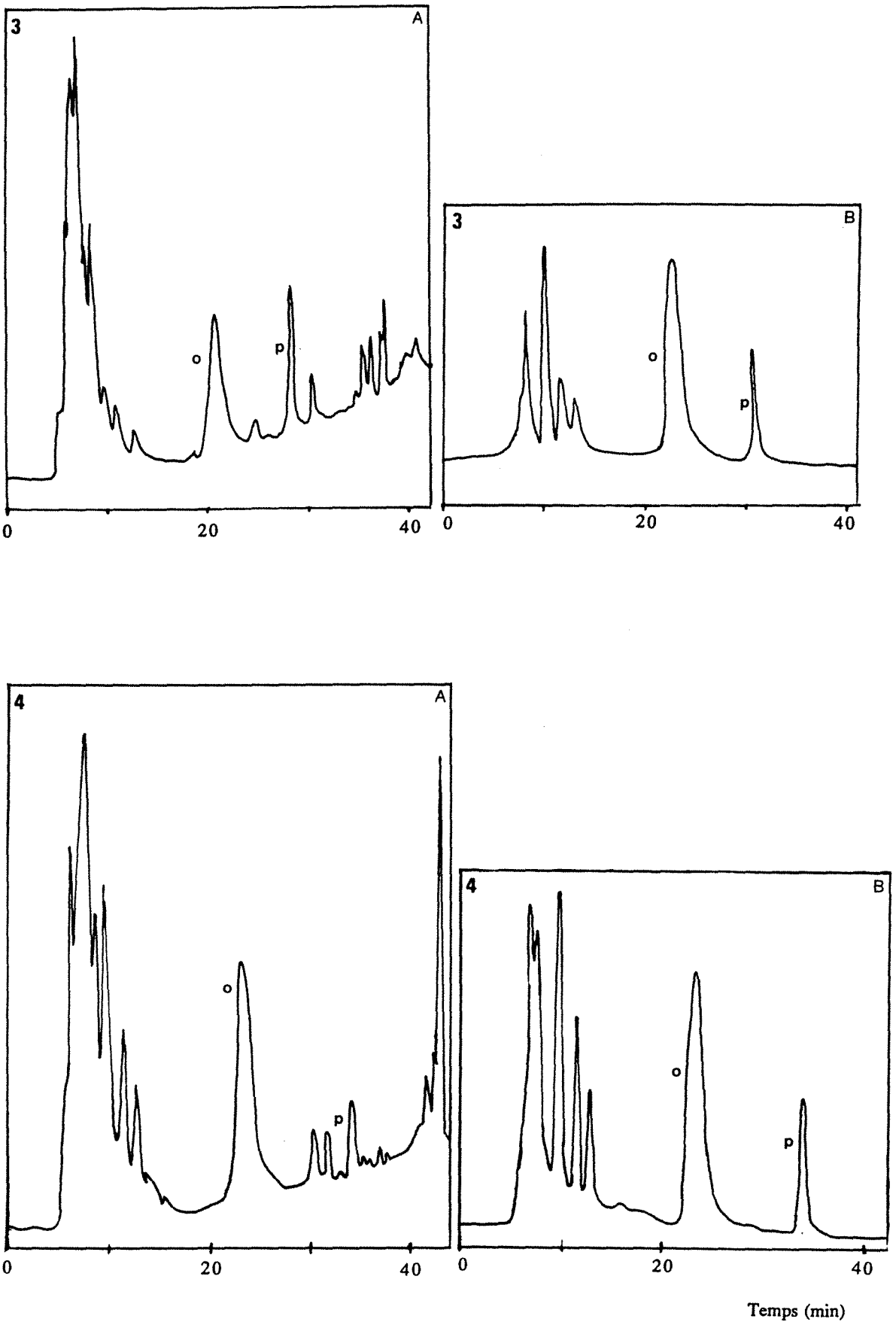


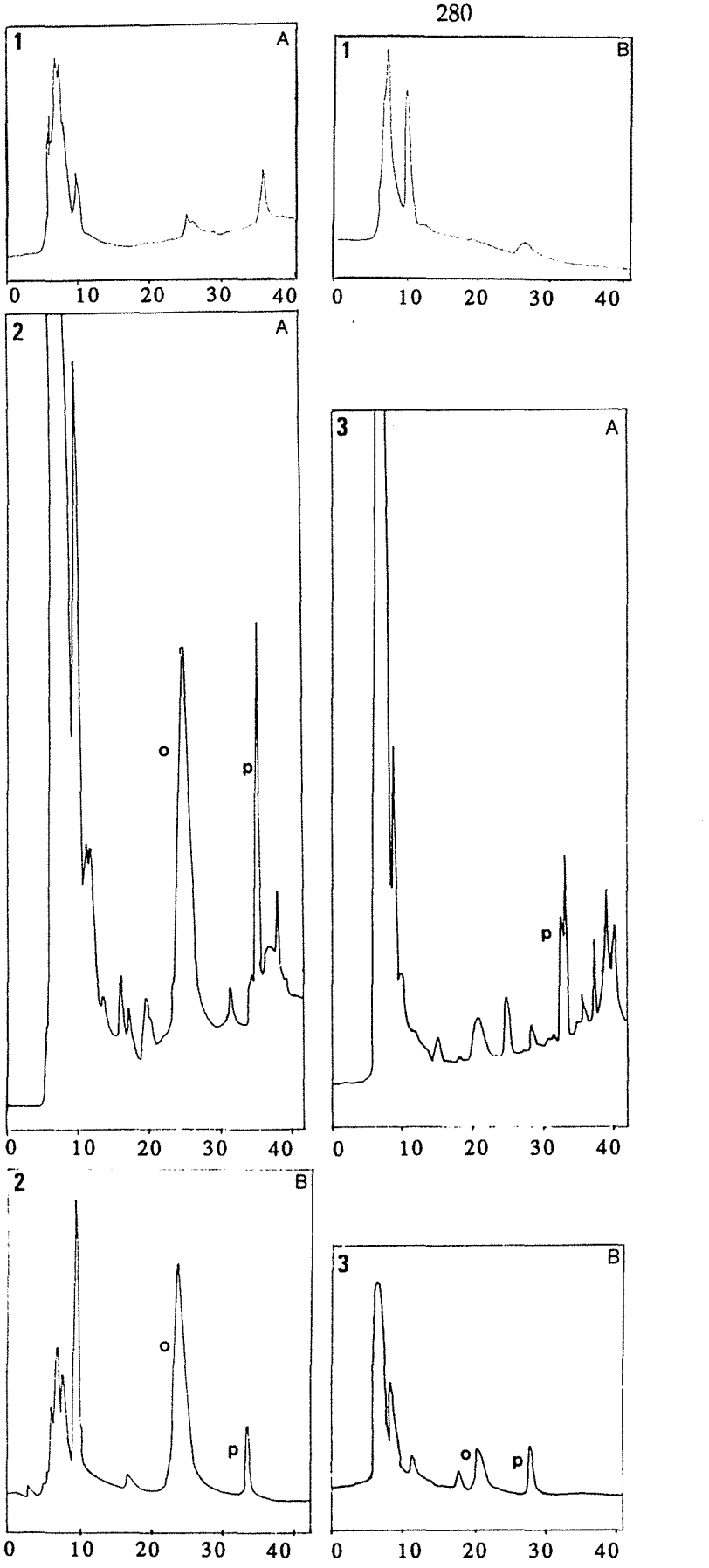
Figure 106 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres libres" d'une moutarde auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

Séparation sur colonne HPLC C18 5 µm.
Solvant Méthanol/Acide formique 5% (v/v)


3
A
o
p
0
20
40
3
B
o
p
0
20
40
4
A
o
p
0
20
40
4
B
o
p
0
20
40
Temps (min)


1
A
0 10 20 30 40
1
B
0 10 20 30 40
2
A
o
p
0 10 20 30 40
3
A
p
0 10 20 30 40
2
B
o
p
0 10 20 30 40
3
B
o
p
0 10 20 30 40
Temps (min)

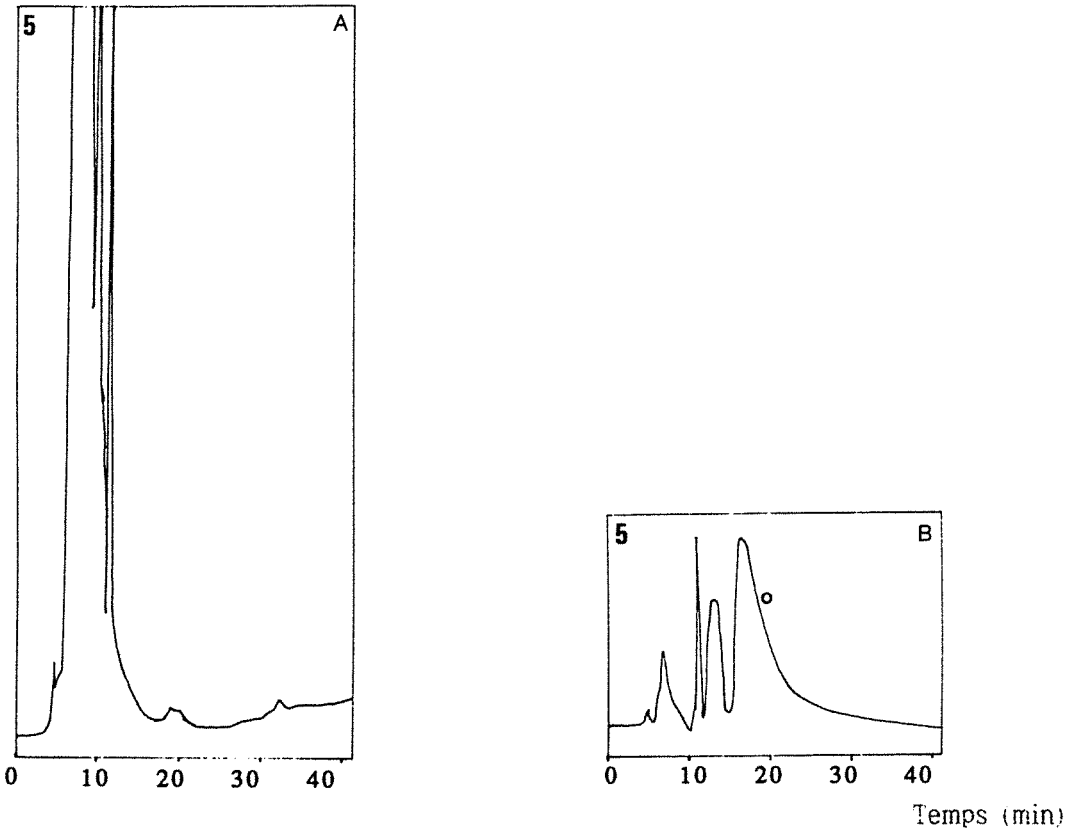


Figure 107 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres libres" d'une moutarde auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours
5. Moutarde oxydée pendant 15 jours

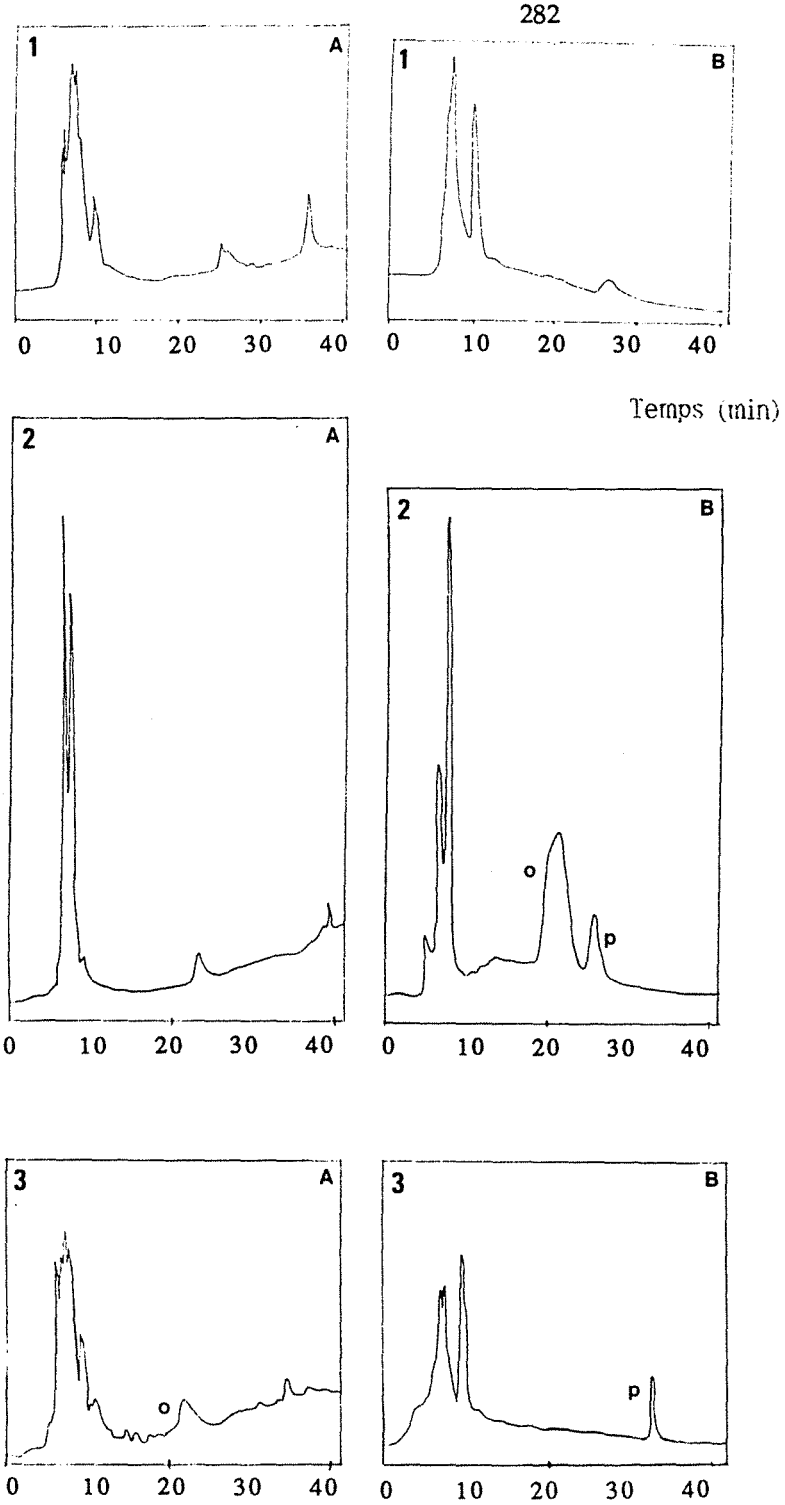


Figure 108 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres libres" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 7 jours

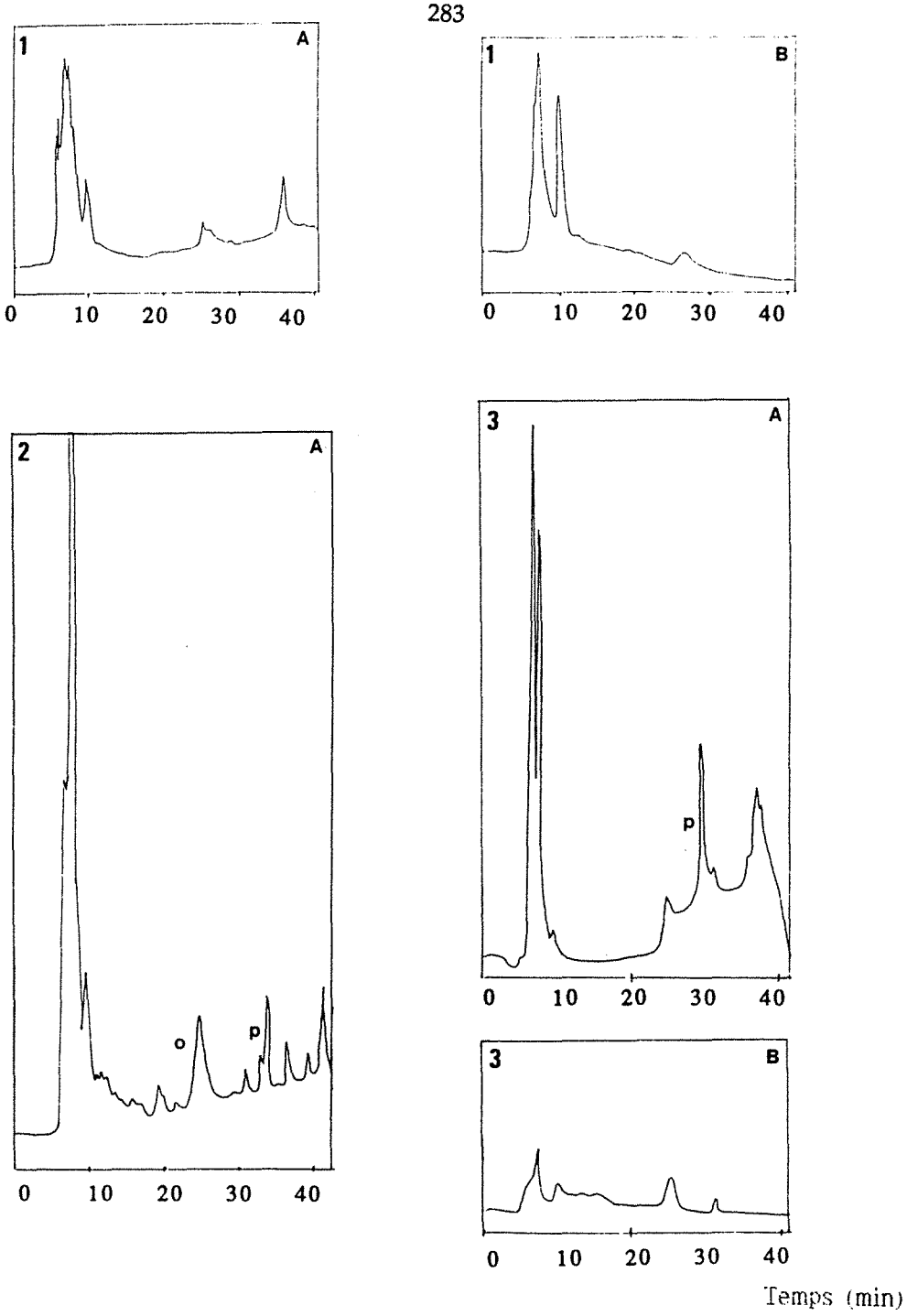
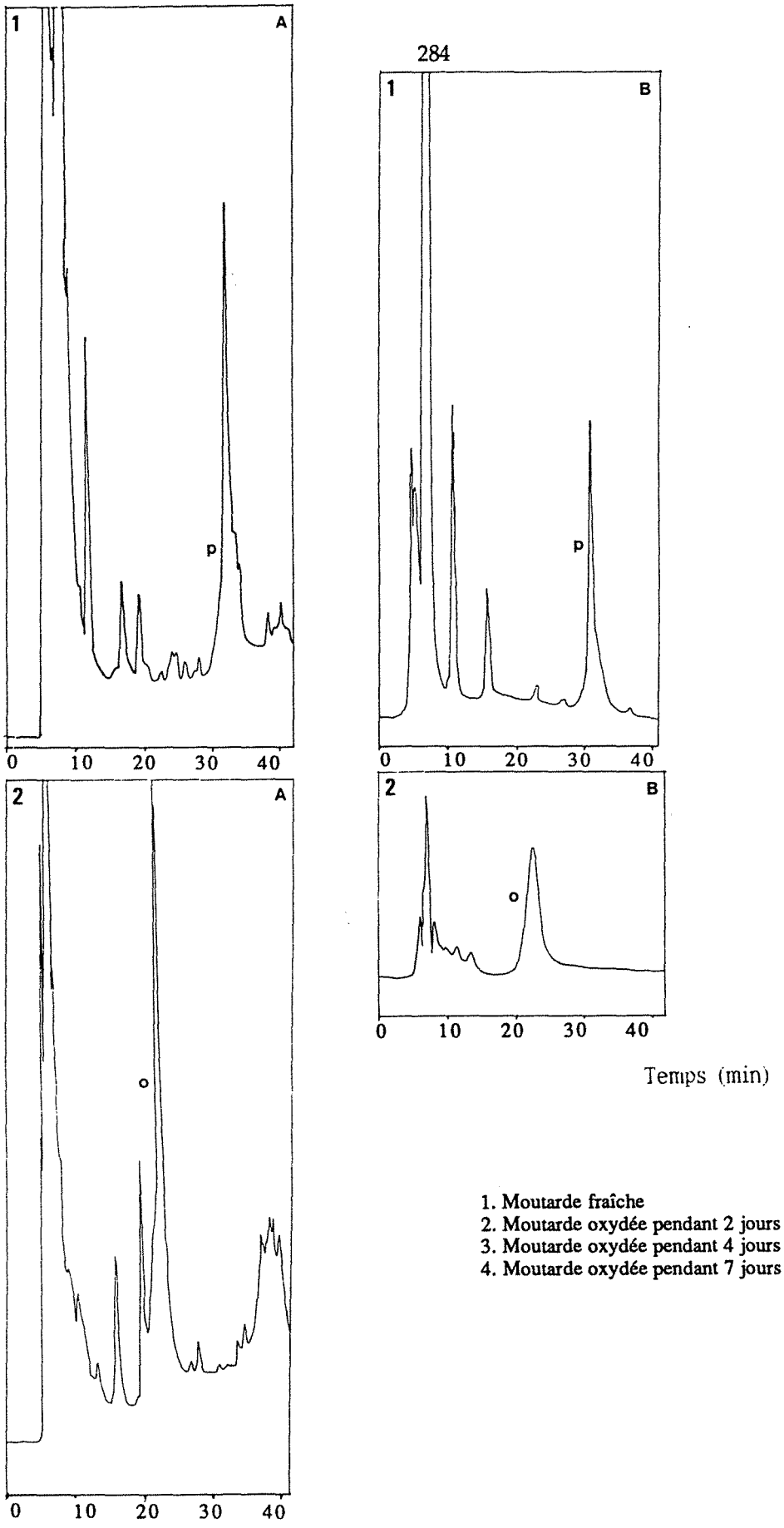


Figure 109 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres libres" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

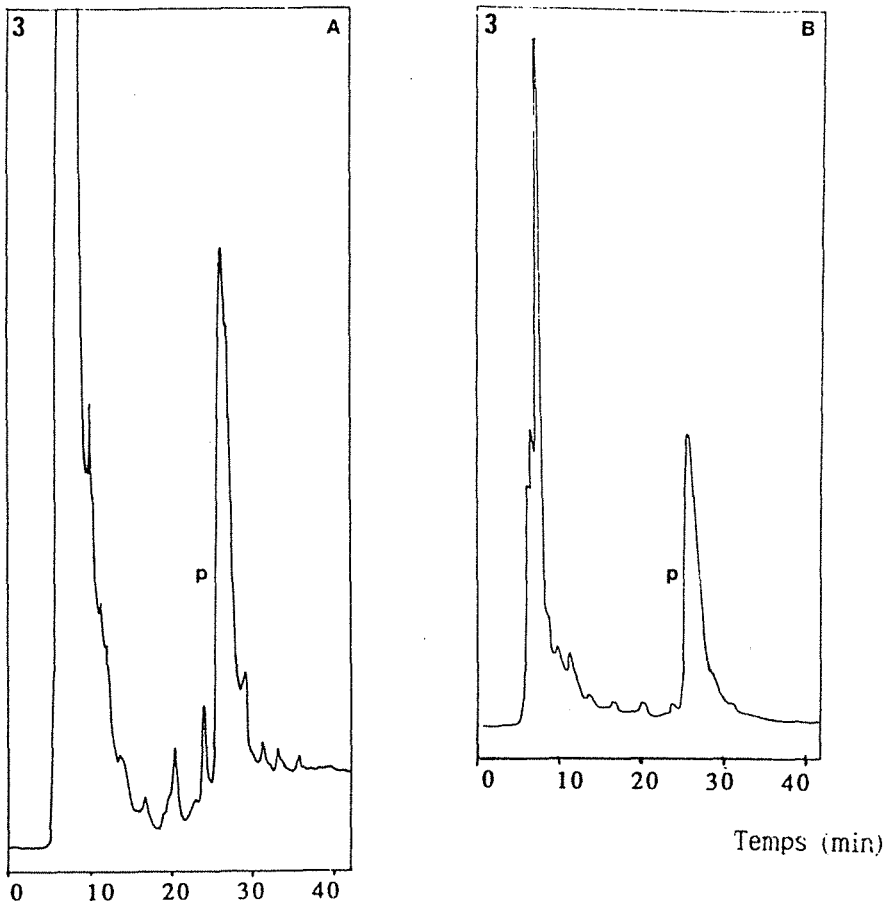
1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 7 jours

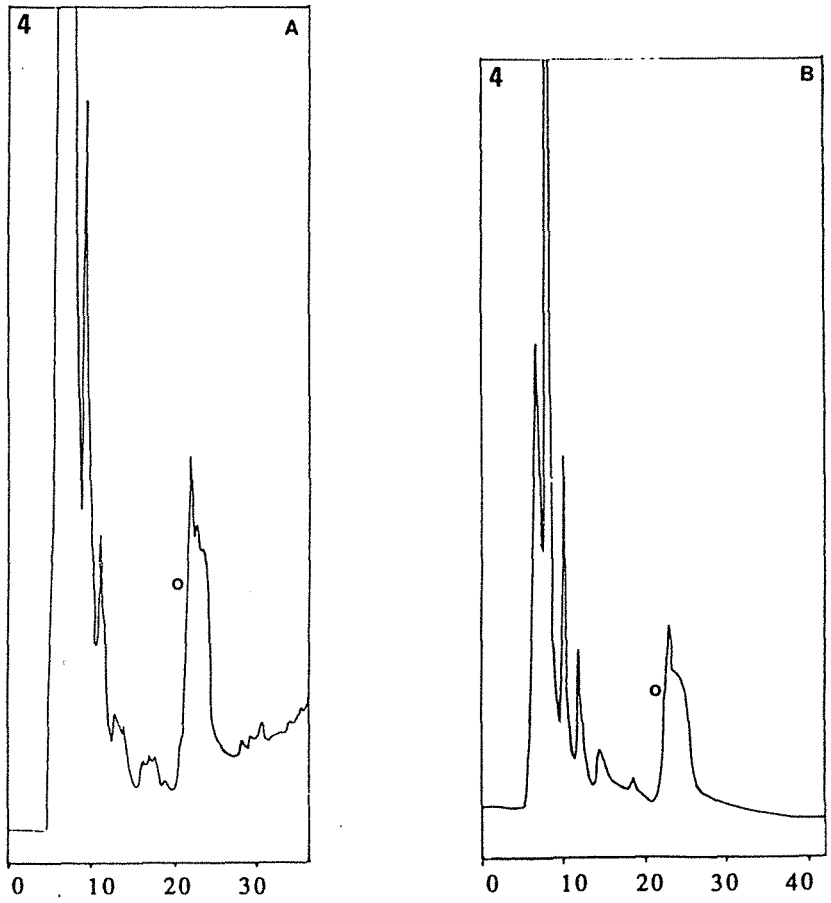


1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

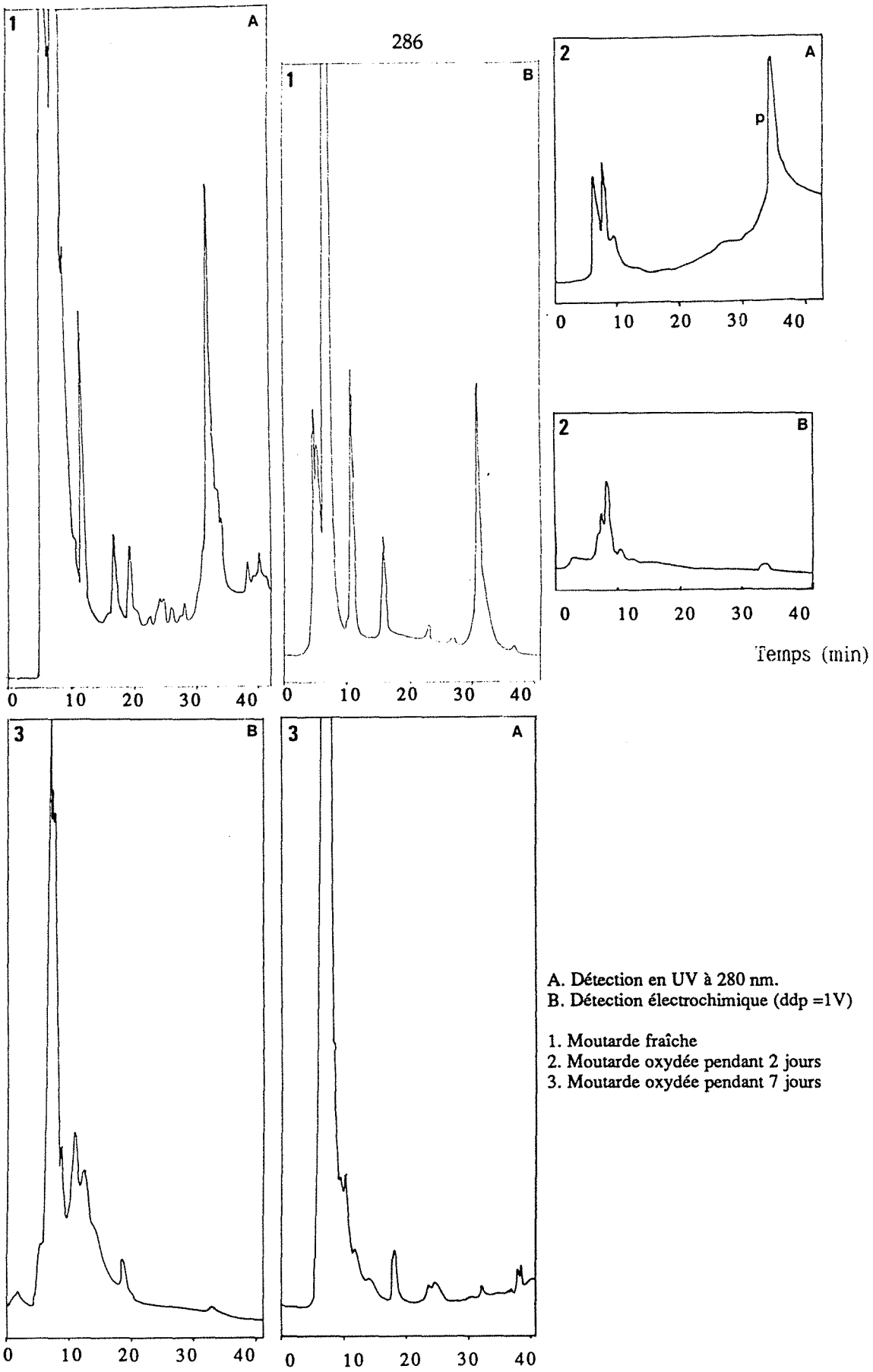
Figure 110 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)





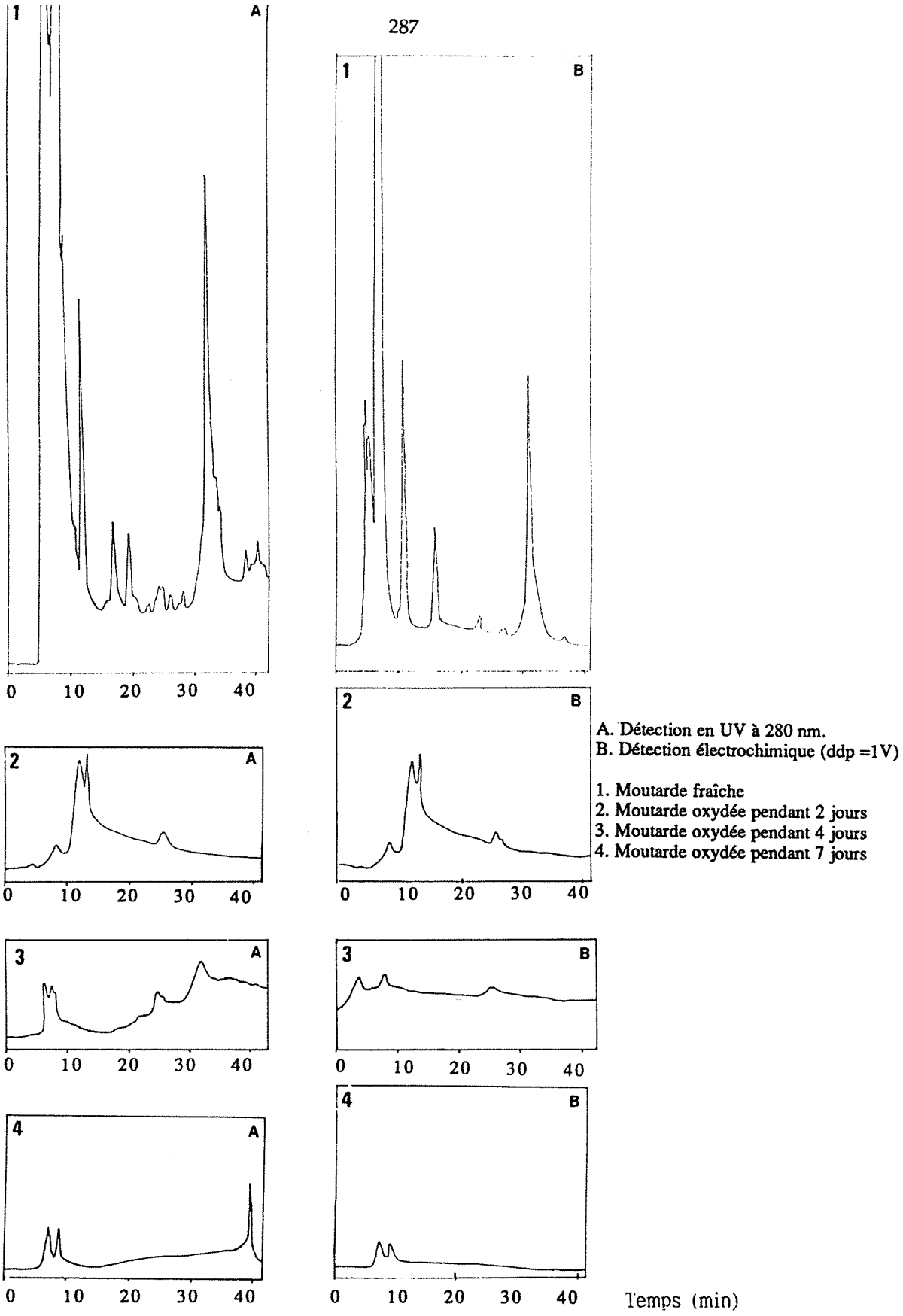
Séparation sur colonne HPLC C18 5 µm.
Solvant Méthanol/Acide formique 5% (v/v)



A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 7 jours

Figure 111 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.



A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

Figure 112 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

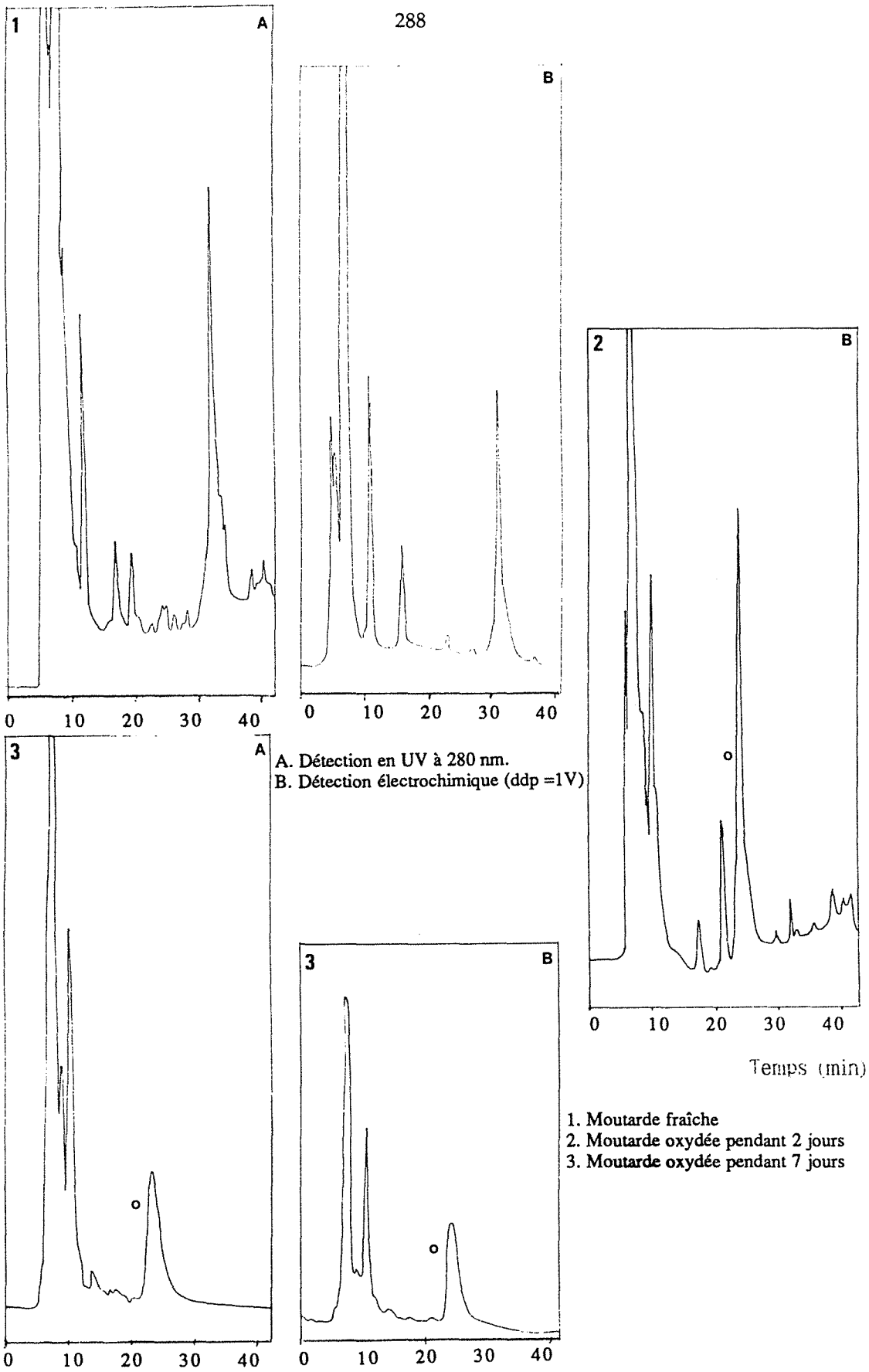


Figure 113 : Séparation chromatographique des extraits "Phénols neutres engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

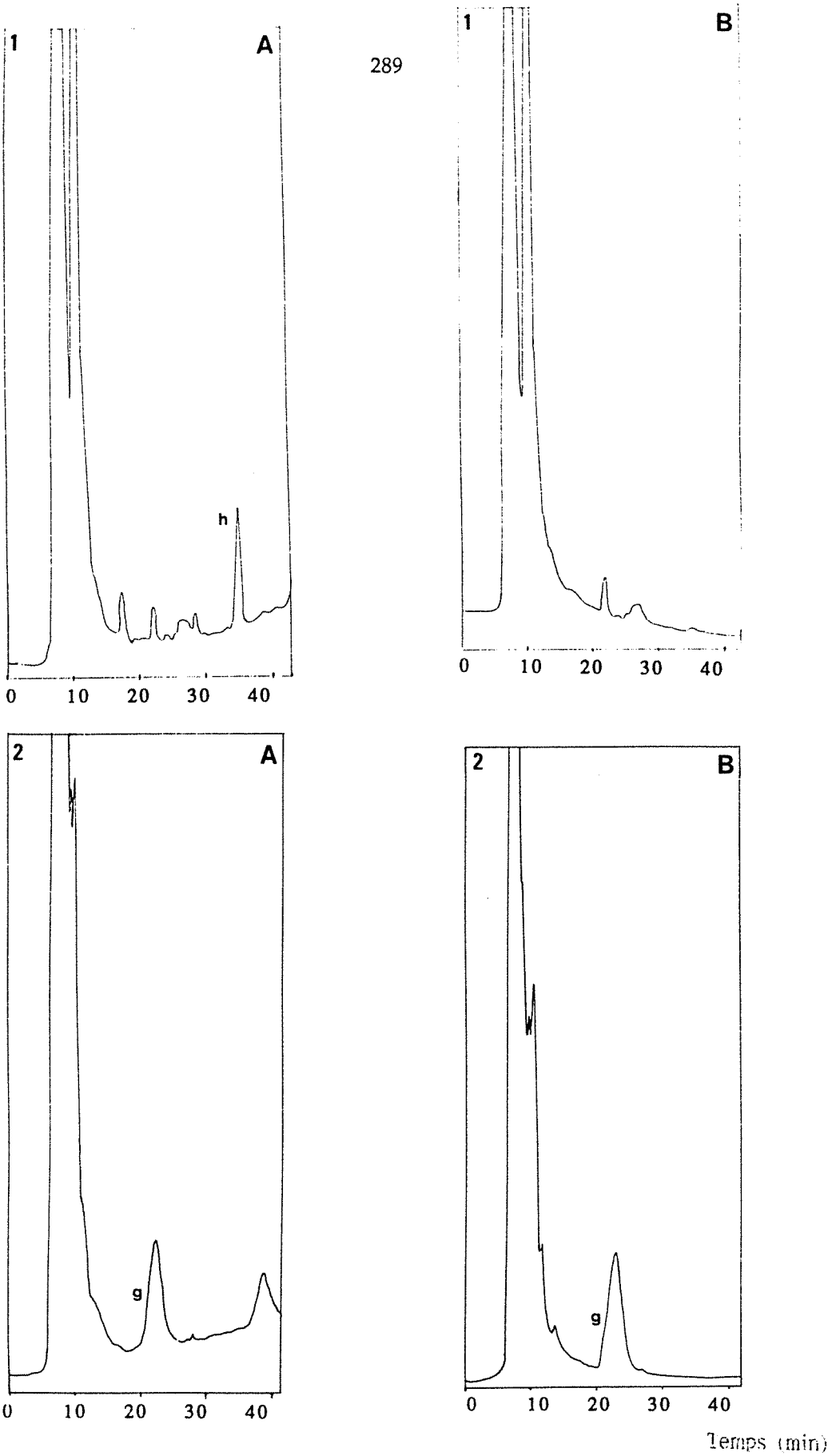
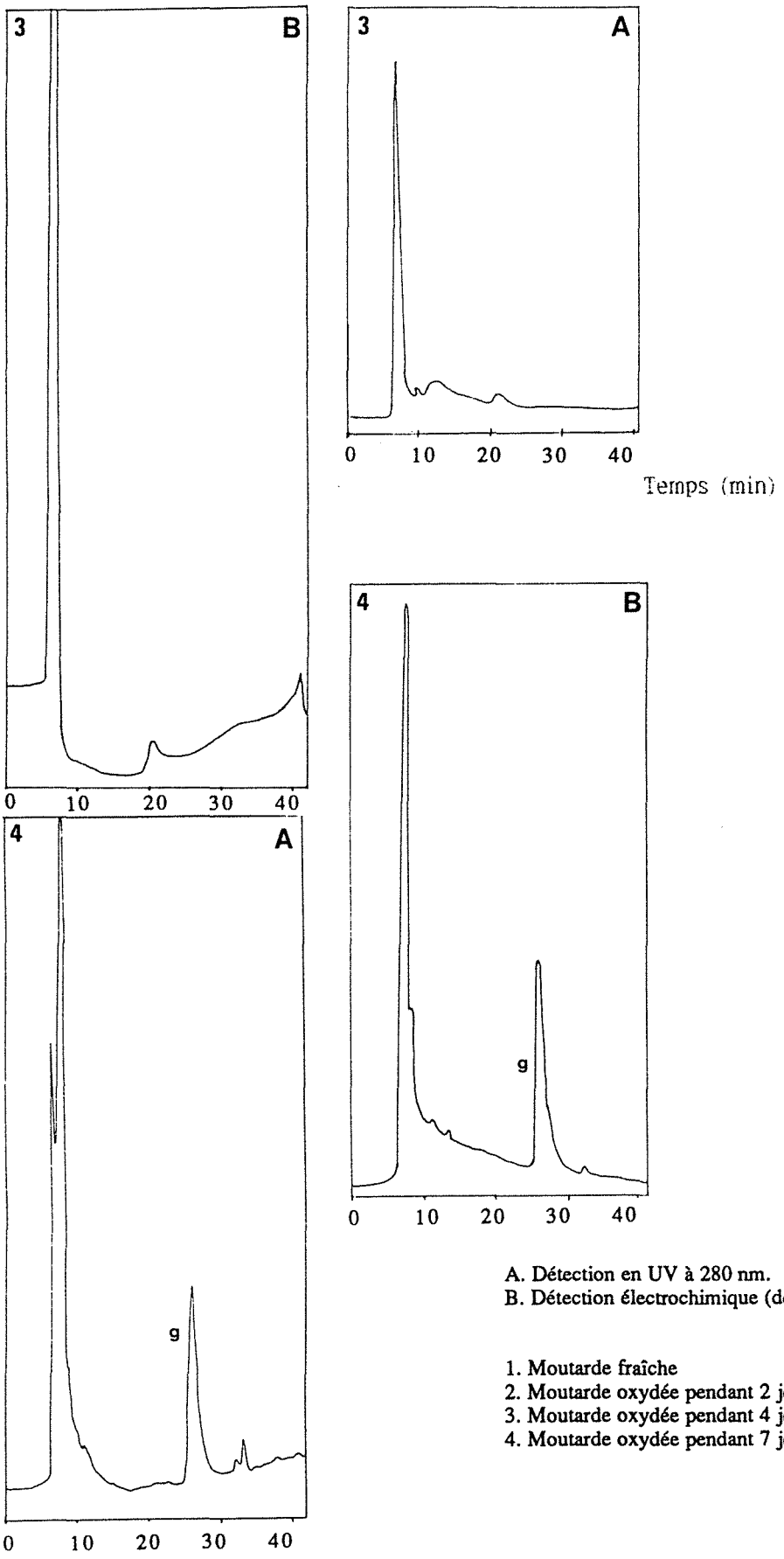


Figure 114 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

Séparation sur colonne HPLC C18 5 µm.
Solvant Méthanol/Acide formique 5% (v/v)



A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours

Figure 114

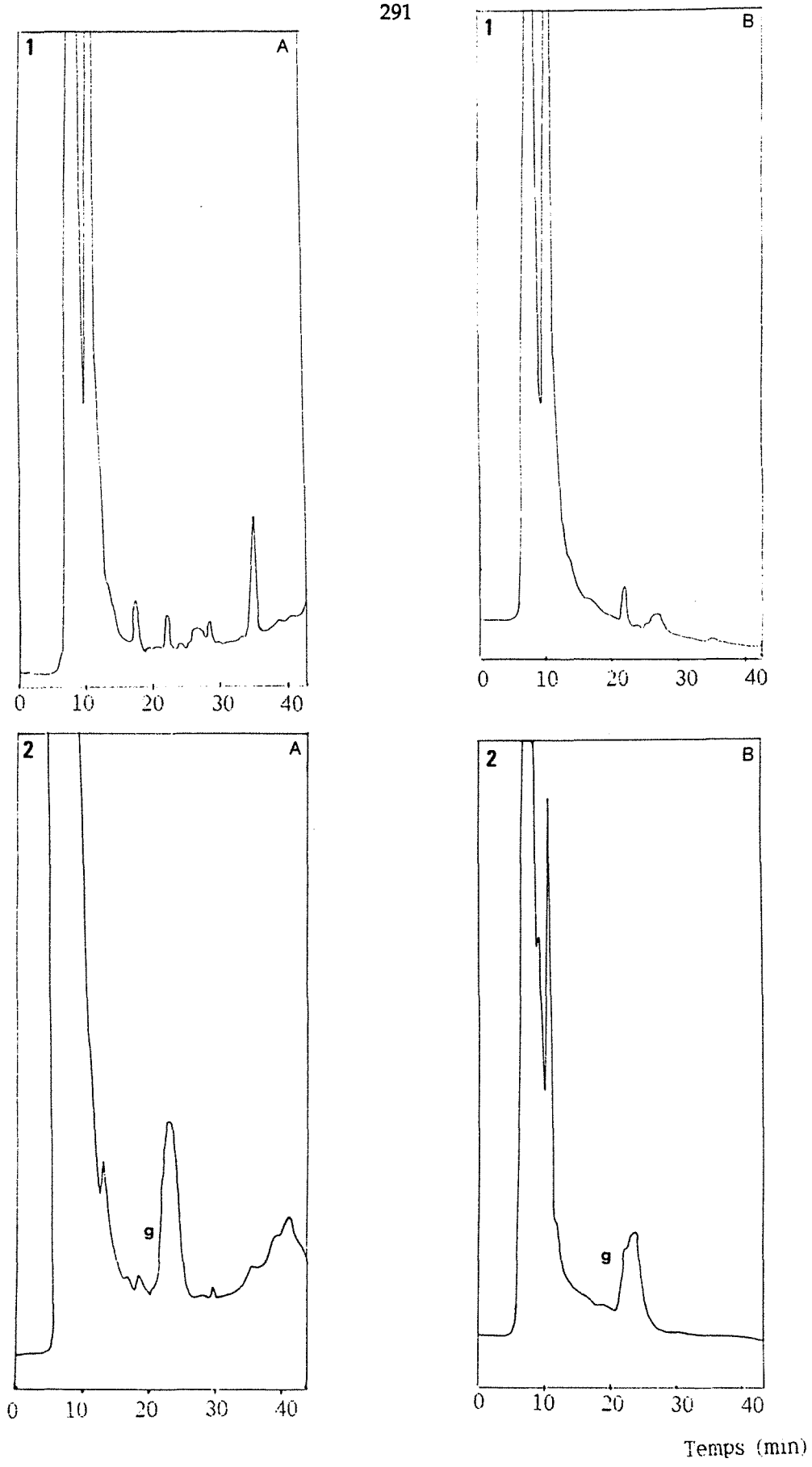
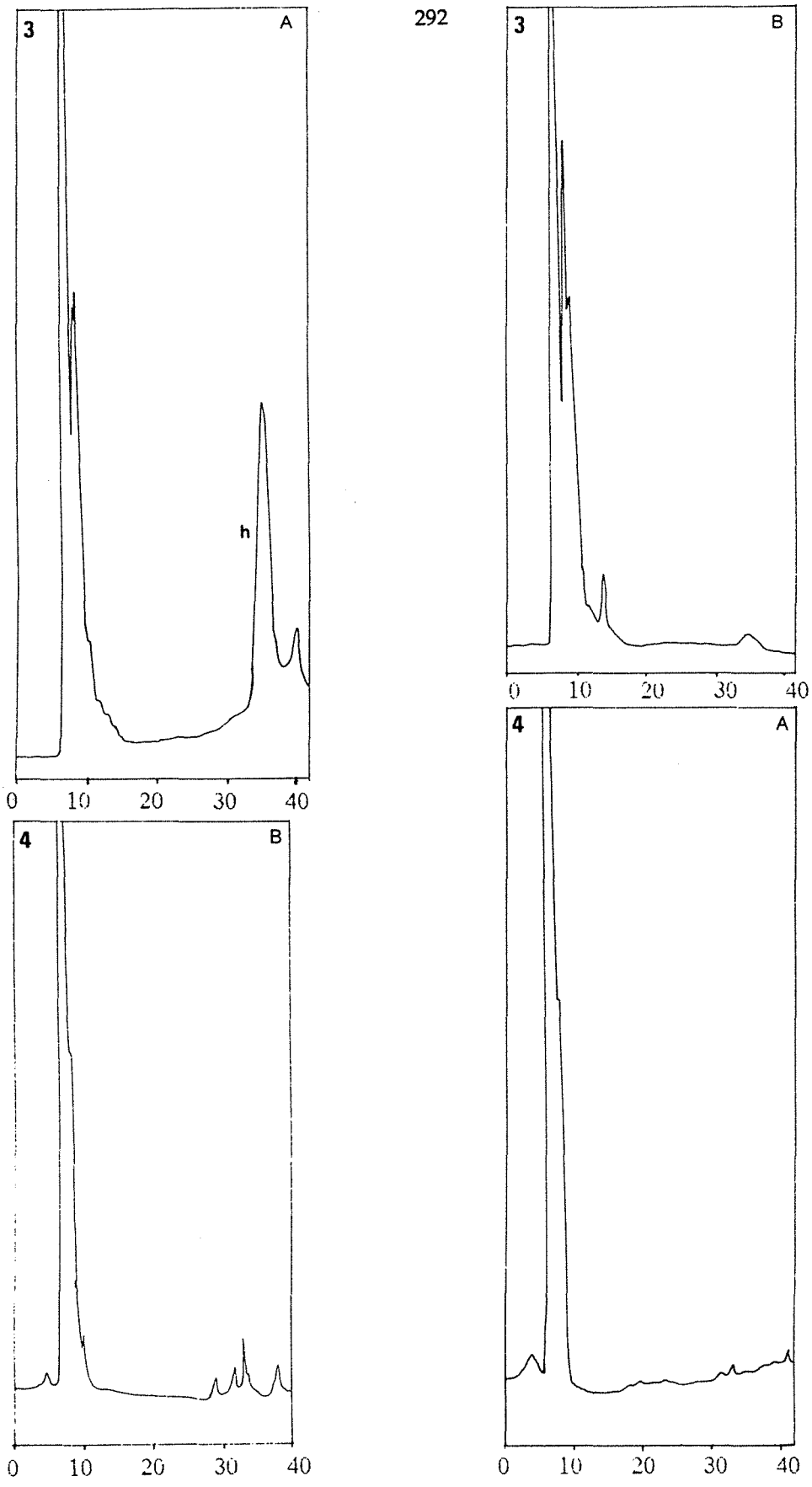

1
A
0
10
20
30
40
1
B
0
10
20
30
40
2
A
g
0
10
20
30
40
2
B
g
0
10
20
30
40
Temps (min)

Figure 115


3
A
h
0
10
20
30
40
3
B
0
10
20
30
40
4
B
0
10
20
30
40
4
A
0
10
20
30
40
Temps (min)

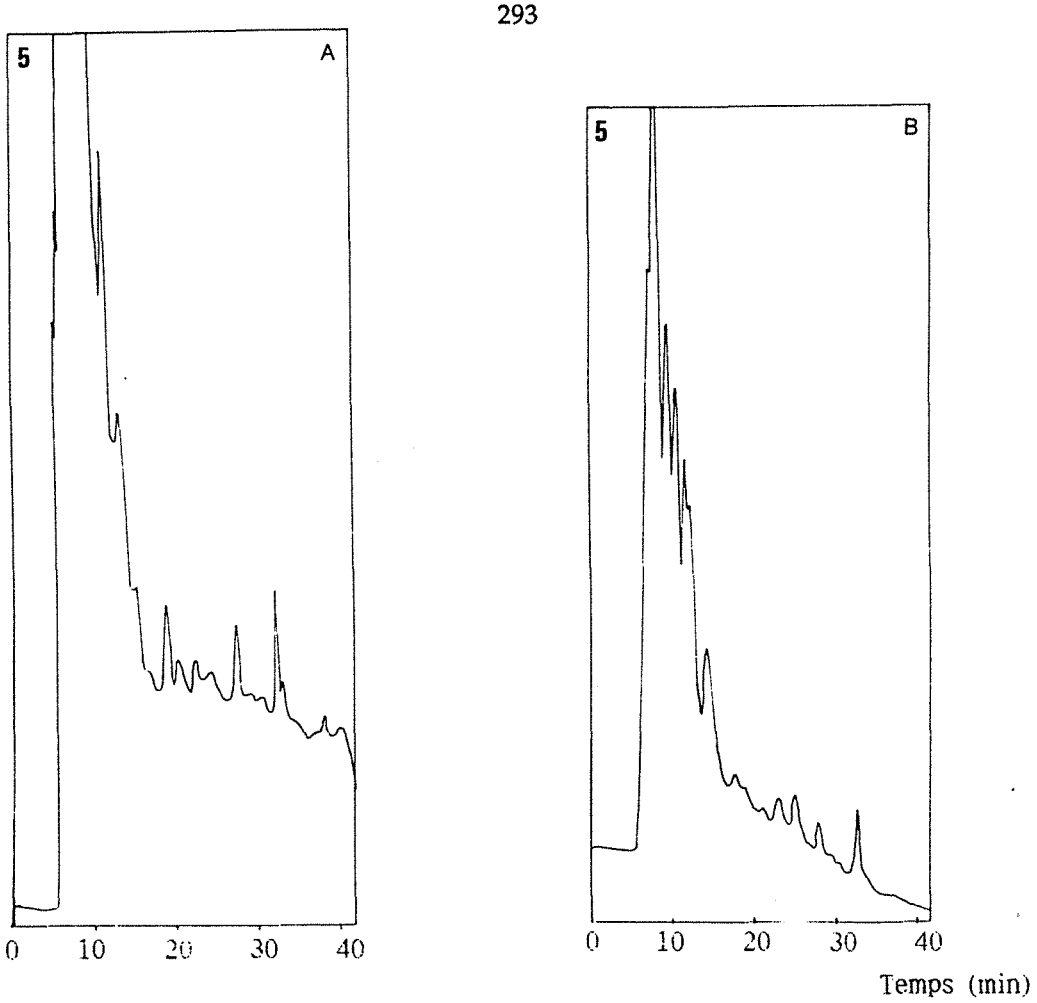


Figure 115 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours
5. Moutarde oxydée pendant 15 jours

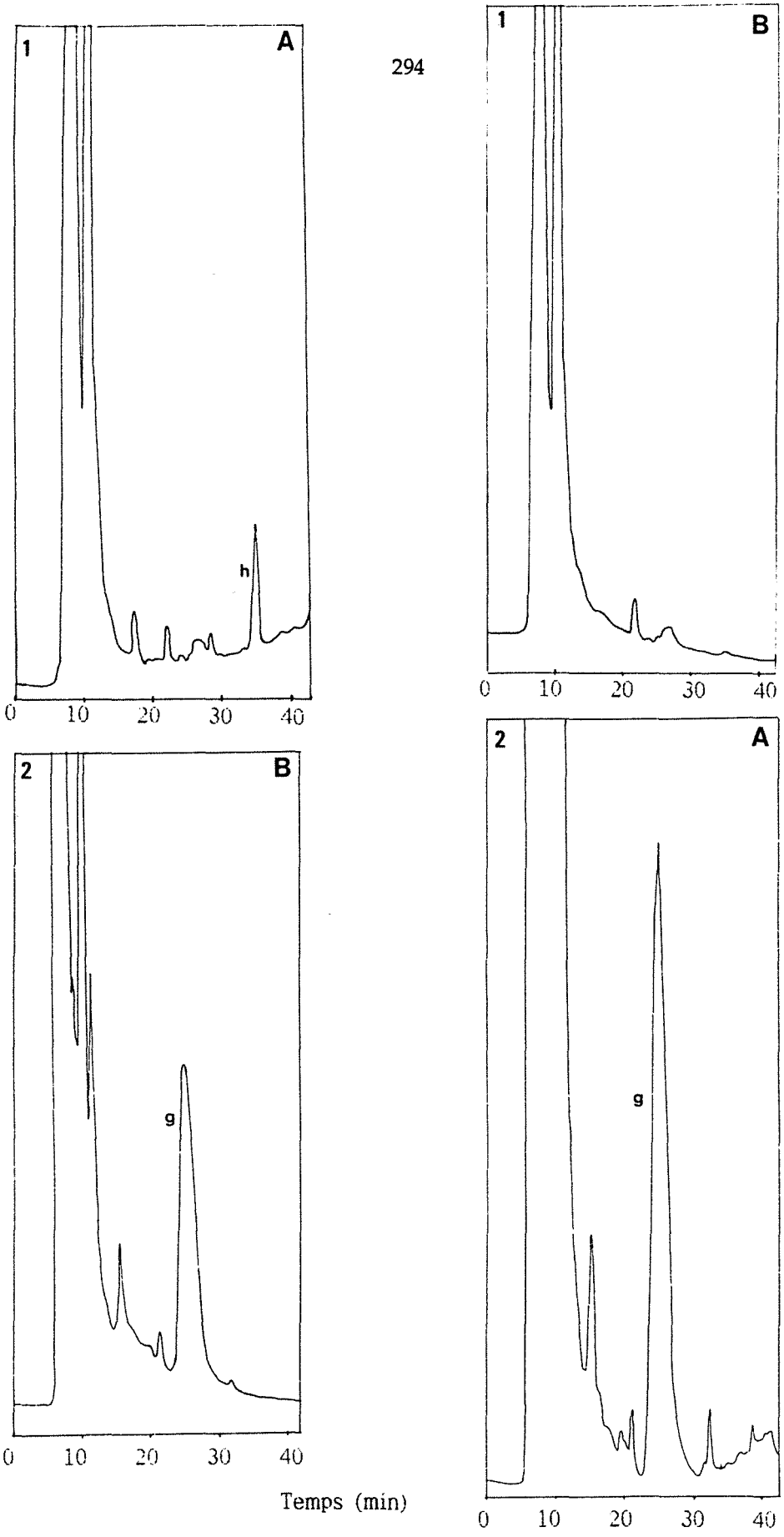
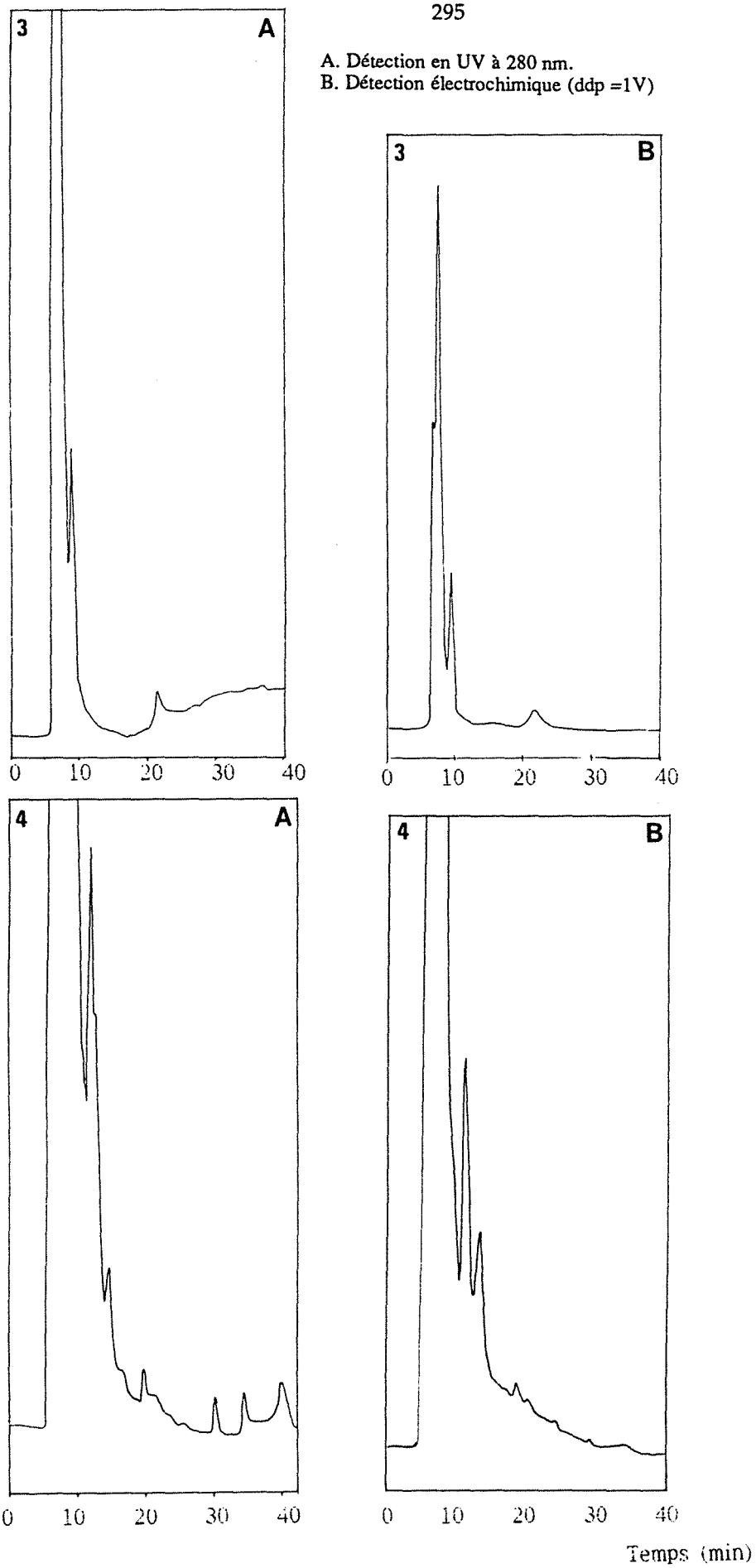
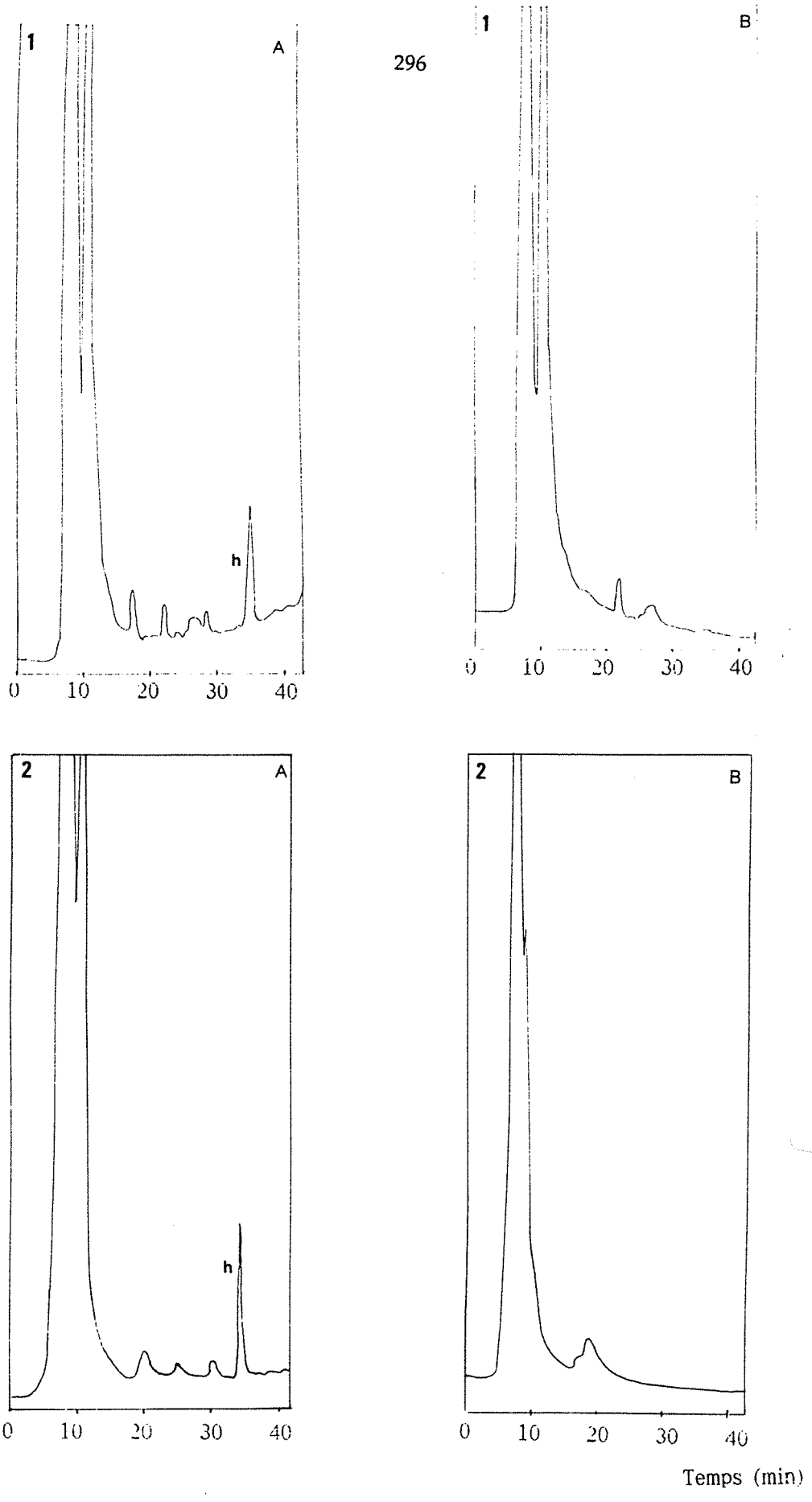


Figure 116 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 20°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)



1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 4 jours
4. Moutarde oxydée pendant 7 jours


1
A
h
0
10
20
30
40
1
B
0
10
20
30
40
2
A
h
0
10
20
30
40
2
B
0
10
20
30
40
Temps (min)

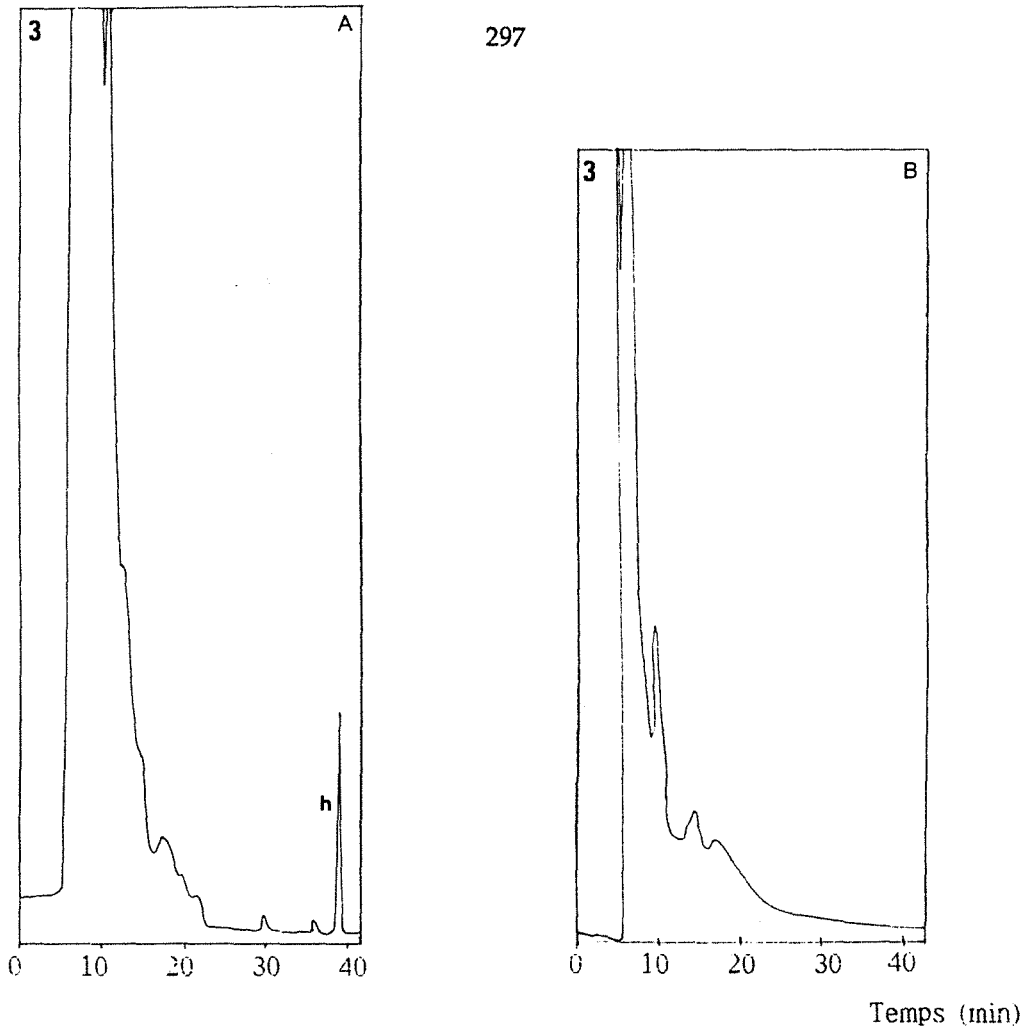


Figure 117 : Séparation chromatographique des extraits "Acides phénoliques engagés dans des liaisons esters solubles" d'une moutarde enrichie en sulfite de sodium (50 ppm) puis auto-oxydée à 50°C, sous pression d'oxygène de 100 bars.

A. Détection en UV à 280 nm.
B. Détection électrochimique (ddp =1V)

1. Moutarde fraîche
2. Moutarde oxydée pendant 2 jours
3. Moutarde oxydée pendant 7 jours