



**HAL**  
open science

# Étude de la thermosensibilité de la polyphénoloxydase de pomme seule ou en présence des constituants de la purée de pomme et de l'acide ascorbique

Jean-Pierre Aka

► **To cite this version:**

Jean-Pierre Aka. Étude de la thermosensibilité de la polyphénoloxydase de pomme seule ou en présence des constituants de la purée de pomme et de l'acide ascorbique. *Alimentation et Nutrition*. 2011. dumas-01101716

**HAL Id: dumas-01101716**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01101716>**

Submitted on 9 Jan 2015

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

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

**CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS  
PARIS**

---

**MEMOIRE**  
**présenté en vue d'obtenir**  
**le DIPLOME d'INGENIEUR C.N.A.M**

**SPECIALITE : SCIENCES ET TECHNIQUES DU VIVANT**  
**OPTION : BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIE DES INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES**

par

**Jean-Pierre AKA**

---

**Étude de la thermosensibilité de la polyphénoloxydase de pomme seule ou en présence des constituants de la purée de pomme et de l'acide ascorbique.**

Soutenu le 04 Octobre 2011

---

**JURY**

**PRÉSIDENT :** M. Jacques NICOLAS

**MEMBRES :** Mme Catherine BILLAUD

Mme Rebecca GARCIA

Mme Marie-Noëlle MAILLARD

Mme Catherine RENARD

Mr Jacques POTUS

## Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de la chaire de Biochimie Industrielle et Agro-Alimentaire du Conservatoire National des Arts et Métiers.

A ce titre, et à bien d'autres, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jacques NICOLAS, professeur titulaire de la chaire. Si l'accueil dès mes débuts au CNAM qu'il m'a réservé fut chaleureux, je retiendrai surtout sa disponibilité, son aide et son indispensable et inaltérable bonne humeur.

Je remercie Madame Rebecca GARCIA, Maître de conférences au C.N.A.M, Madame Marie-Noëlle MAILLARD, Maître de conférences à l'E.N.S.I.A et Madame Catherine RENARD, Directeur de recherche I.N.R.A, d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire.

Je tiens à remercier Madame Catherine BILLAUD, Ingénieur de Recherches à la chaire de Biochimie Industrielle et Agro-Alimentaire pour son encadrement scientifique efficace et son implication de tous les instants.

Je remercie infiniment Madame Aline BOUSSARD pour tout...Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié sincère.

Je remercie également Monsieur Loïc LOUARME, pour son aide et ses précieux conseils techniques tout au long de ces travaux.

Merci à toute l'équipe du laboratoire, qui ont été et sont plus que des « collègues » à mes yeux, leur bonne humeur, conseil et aide m'ont accompagné depuis mes débuts au C.N.A.M.

## Liste des abréviations

**3H2P** : 3 hydroxy-2-pyrone

**4-MC** : 4-méthylcatéchol

**5-HMF** : 5-hydroxyméthylfurfural

**AA** : acide ascorbique

**AF** : acide furoïque

**CEP** : champ électrique pulsé

**CG** : acide chlorogénique

**CLHP-DAD** : chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette de diodes

**CTCPA** : centre technique de la conservation des produits agricoles

**DHA** : acide déhydroascorbique

**Ea** : énergie d'activation

**EB** : extrait brut

**EPI** : (-) épicatechine

**INRA** : institut national de la recherche agronomique

**K<sub>m</sub>** : constante de Michaelis (mM)

**PC** : paroi cellulaire

**PM** : poids moléculaire

**PPO** : polyphénoloxydase

**Prc** : procyanidines

**PVPP** : polyvinylpyrrolidone

**URC** : unité de recherches cidricoles

**UV** : ultra-violet

**V<sub>m</sub>** : vitesse maximale (nkat)

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	i
<b>Liste des abréviations</b> .....	ii
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 1: TRAVAUX ANTÉRIEURS</b> .....	<b>3</b>
<b>I.Le brunissement enzymatique des végétaux</b> .....	4
<b>I.1 Les polyphénoloxydases</b> .....	5
I.1.1 Les réactions catalysées.....	5
I.1.2 Localisation.....	6
I. 1. 3. Structure et mécanismes réactionnels.....	7
I.1.4 Spécificité.....	8
I.1.5 Effets du pH et de la température.....	9
<b>I.2 Contrôle du brunissement enzymatique</b> .....	10
<b>II.De la pomme à la purée</b> .....	12
<b>II.1 Caractérisation de la pomme</b> .....	12
<b>II.2 Les composés phénoliques</b> .....	13
<b>II.3 Les procyanidines</b> .....	16
<b>II.4 Les parois cellulaires</b> .....	17
<b>II.5 L'acide ascorbique</b> .....	18
<b>II.6 L'acide déhydroascorbique</b> .....	20
<b>II.7 Les autres produits de la dégradation de l'acide ascorbique</b> .....	21

<b>III. Procédés de fabrication de la purée de pommes</b> .....	22
<b>III.1 Généralités des traitements thermiques</b> .....	22
<b>III.2 Traitements innovants</b> .....	23
III.2.1 Le chauffage ohmique.....	24
III.2.2 Les Champs Electriques Pulsés.....	26
III.2.3 Les Ultrasons.....	27
<b>Conclusions et objectifs de recherche</b> .....	28

## **Chapitre 2 : MATERIELS ET METHODES** **29**

<b>I. Matériels</b> .....	30
<b>I.1 Matériel végétal, purées industrielles et commerciales</b> .....	30
<b>I.2 Préparation de l'extrait enzymatique de PPO de pomme</b> .....	30
<b>I.3 Liste des réactifs</b> .....	32
<b>II. Dosage de l'activité enzymatique</b> .....	33
<b>II.1 Mesure par polarographie</b> .....	33
<b>II.2 Choix des conditions opératoires</b> .....	33
II.2.1 Choix du substrat .....	34
II.2.2 Influence du pH du milieu réactionnel .....	34
II.2.3 Etablissement des milieux modèles .....	34
II.2.4 Disponibilité en oxygène dans les milieux modèles.....	35

<b>II.3 Traitements thermiques .....</b>	<b>36</b>
II.3.1 Matériel .....	36
II.3.2 Composition des milieux modèles.....	36
II.3.4 Protocole de traitement thermique .....	37
<b>III.Méthode de dosage des composés phénoliques (CG, EPI) par CLHP-UV .....</b>	<b>38</b>
<b>IV.Méthode de dosage de l'acide ascorbique par CLHP-UV .....</b>	<b>39</b>
<b>V.Méthode de dosage des produits de dégradation de l'acide ascorbique par CLHP-UV.....</b>	<b>39</b>
<b><u>Chapitre 3 : RÉSULTATS</u></b>	<b><u>41</u></b>
<b>I.Etudes préliminaires : choix des conditions opératoires.....</b>	<b>42</b>
<b>I.1 Choix des extraits enzymatiques, des conditions de dosage et des conditions de sivi de l'activité résiduelle dans les milieux modèles .....</b>	<b>42</b>
<b>I.2 Evolution de l'activité PPO de pomme en fonction de la température du traitement thermique.....</b>	<b>45</b>
<b>I.3 Calcul des vitesses de dénaturation et détermination de l'énergie d'activation de dénaturation de la PPO de pomme.....</b>	<b>46</b>
<b>II.Comparaisons de la stabilité de l'extrait brut de PPO à 20 et à 50 °C dans différents milieu .....</b>	<b>50</b>
<b>II.1 Effet de l'ajout de sels et de sucres.....</b>	<b>50</b>

<b>II.2 Effet de l'ajout CG et / ou d'EPI</b> .....	51
II.2.1 Stabilité de la PPO .....	51
II.2.2 Consommation de CG et d'EPI à 20 et 50 °C .....	52
<b>II.3 Effet de l'ajout d'acide ascorbique</b> .....	55
II.3.1 Stabilité de la PPO en présence d'AA .....	55
II.3.2 Consommation de l'AA à 20 et 50 °C .....	57
<b>II.4 Effet de l'ajout de produits de dégradation de l'acide ascorbique</b> .....	58
II.4.1 Effet de l'ajout de DHA à 20 et 50 °C.....	59
II.4.2 Effet de l'ajout d'autres produits de dégradation de l'AA à 20 et 50 °C.....	60
<b>II.5 Effet de l'ajout de CG et / ou d'EPI et / ou d'acide ascorbique</b> .....	61
II.5.1 Stabilité de la PPO en présence de CG, EPI et AA.....	61
II.5.2 Consommation de CG, EPI et AA .....	62
<b>II.6 Effet de l'ajout de procyanidines de type B<sub>2</sub></b> .....	63
<b>II.7 Effet de l'ajout de parois cellulaires</b> .....	64
<b>II.8 Effet de l'ajout de purée de pommes</b> .....	66
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	68
<b>Références bibliographiques</b> .....	71
<b>Annexe 1</b> .....	83
<b>Annexe 2</b> .....	84
<b>Liste des tableaux</b> .....	88
<b>Liste des figures</b> .....	89



## Introduction

Les phénomènes de brunissement dans les produits alimentaires à base de fruits et légumes sont fréquemment observés, notamment lors des traitements mécaniques (pelage, broyage) ou thermiques (chauffage, congélation-décongélation). L'apparition de pigments bruns, entraîne des modifications importantes des produits transformés, diminue fortement leurs attractivités organoleptiques et leurs richesses en composés d'intérêts nutritionnels (polyphénols). Ces brunissements essentiellement d'origine enzymatique, sont principalement catalysés par les polyphénoloxydases (PPO, EC 1.14.18.1), des métalloenzymes à cuivre qui provoquent l'oxydation de composés phénoliques en quinones en présence d'oxygène moléculaire. Par la suite, ces quinones se polymérisent et donnent des composés bruns.

Actuellement, les procédés de traitements thermiques « traditionnels » tels que la pasteurisation ou la stérilisation, entraînent une dénaturation très rapide de la PPO (donc réduisent voire évitent l'oxydation enzymatique) mais ne répondent pas à la demande actuelle des consommateurs qui se tournent de plus en plus vers des produits transformés à base de fruits possédant des caractéristiques organoleptiques (couleur, texture, arôme,...) aussi proches que possible de celles du produit frais. Plusieurs innovations (champs électriques pulsés, chauffage ohmique...) ont donc vu le jour en agroalimentaire mettant en œuvre des technologies « modérées » avec non seulement une sécurité alimentaire accrue mais également une gamme de texture, d'arômes et de composés nutritionnels élargie.

Dans le but de répondre à cette demande, le projet « **Tempantiox** » s'inscrit dans le cadre du programme national de recherche en alimentation et nutrition humaine (PNRA), ayant pour enjeux scientifiques, la compréhension du devenir des polyphénols, des parois végétales, de la vitamine C et de leurs interactions mutuelles afin d'objectiver les qualités organoleptiques et nutritionnelles de desserts fruitiers à base de pomme. Les polyphénols sont les substrats du brunissement enzymatique et ont un rôle antioxydant ; quelle voie de dégradation est prépondérante, l'oxydation enzymatique, la dégradation thermique ou encore la fixation sur des parois ? La vitamine C est utilisée comme auxiliaire de fabrication (antibrunissement), les parois interviennent dans la texture et en tant que fibre alimentaires (Renard *et al.*, 2001). Quel est l'impact des traitements thermiques sur ces ingrédients et leurs voies de dégradations ?

Ce travail de mémoire s'inscrit dans cette volonté de compréhension des interactions entre ces différentes molécules endogènes à la pomme et la polyphénoloxydase sous l'influence des traitements thermiques. Dans ce cadre, nos objectifs sont :

- l'établissement de cinétiques de dénaturation thermique de la PPO de pomme dans un système modèle défini,
- l'étude des interactions entre les composés phénoliques, l'oxygène et la PPO au cours de traitements thermiques,
- l'étude des interactions entre l'acide ascorbique, l'oxygène et la PPO au cours de traitements thermiques,
- la détermination de l'impact des parois végétales sur la PPO au cours de traitements thermiques et
- l'étude de l'évolution de la PPO dans une matrice « purée de pomme » au cours de traitements thermiques.

Dans une première partie bibliographique, après une synthèse sur le brunissement enzymatique, une description de la matrice sera effectuée. Cette première partie s'attache à passer en revue certaines caractéristiques intrinsèques des pommes, les propriétés physico-chimiques des composés phénoliques, des parois cellulaires, de l'acide ascorbique et de ses dérivés, ainsi qu'une présentation succincte de divers modes de traitements thermiques et athermiques.

La seconde partie sera consacrée à la détermination des conditions optimales de mesures de l'activité enzymatique PPO au cours de traitements thermiques dans des milieux réactionnels composés initialement des constituants pris indépendamment puis progressivement complexifiés jusqu'au stade d'une matrice purée. La quantification de l'oxygène présent dans les milieux modèles sera un élément important.

L'exposé des résultats en troisième partie, tentera de caractériser les cinétiques de dénaturation de la PPO et d'établir les interactions entre cette dernière et les composés endogènes de la pomme.

Pour terminer, un bilan des résultats issus des différentes études menées au cours de ce mémoire et les perspectives amenées par ce travail sont présentés.

## **Chapitre 1 : TRAVAUX ANTÉRIEURS**

## **I. Le brunissement enzymatique des végétaux**

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales permettant d'évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes. Il ne se produit que lorsque les tissus sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage : les vacuoles contenant les substrats phénoliques sont rompues et ces derniers sont ainsi mis en contact avec la PPO qui est généralement présente dans les plastes ou chloroplastes des cellules intactes.

Le brunissement enzymatique peut parfois être bénéfique à l'acceptabilité du produit par le consommateur. En effet, que ce soit pour les raisins, prunes, dattes et figues, le brunissement enzymatique est nécessaire au développement de leur couleur dorée caractéristique des fruits secs. De même, l'apparition de la couleur du cacao est facilitée par le brunissement enzymatique lors de la fermentation et le séchage des fèves (Chériot, 2006).

Cependant, le brunissement enzymatique est considéré le plus souvent comme une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes. Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (Whitaker et Lee, 1995). Ces lourdes pertes ont suscité un intérêt considérable dans la compréhension et le contrôle de l'activité polyphénoloxydase dans les aliments. Les salades et autres légumes feuillus, les pommes de terre et autres tubercules riches en amidon tels que les patates douces, l'igname, de même que les champignons, les pommes, les bananes, les pêches et encore beaucoup d'autres fruits ou légumes sont sensibles au brunissement enzymatique. Ils peuvent donc être l'objet de pertes économiques pour tous les acteurs du secteur de la transformation des fruits et légumes. Ces pertes sont d'autant plus grandes que la détérioration des produits a lieu en fin de chaîne de production, peu de temps avant l'achat par le consommateur alors que des coûts importants (stockage, manutention, transport) ont déjà été engendrés. Il est donc primordial de contrôler le brunissement enzymatique depuis la récolte jusqu'à l'achat par le consommateur afin de minimiser les pertes et maintenir la valeur économique du produit.

Le brunissement enzymatique des aliments résulte principalement de l'activité enzymatique des polyphénoloxydases (PPO). Ce sont des oxydoréductases largement répandues dans le monde végétal (pomme, poire, avocat, banane, pomme de terre, champignon, artichaut, laitue, papaye, pêche...) (Martinez et Whitaker, 1995).

Les polyphénoloxydases (PPO, EC 1.10.3.1) représentent un groupe d'enzymes qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques, en faisant intervenir l'oxygène moléculaire, en quinones, qui par la suite se polymérisent spontanément pour former des polymères bruns, responsables de la coloration brune, le plus souvent indésirable, observée sur les fruits et légumes endommagés (Cheftel et Cheftel, 1976).

Les peroxydases (EC 1.11.1.7) sont également capables de catalyser ce type de réaction, en présence de peroxyde d'hydrogène, mais interviennent peu dans le brunissement enzymatique suite à une manipulation des fruits et légumes. Elles sont plutôt actives au cours des désordres physiologiques du végétal ( $H_2O_2$  produit après un stress).

Après une présentation des polyphénoloxydases, nous verrons les différents moyens mis en œuvre pour contrôler le brunissement enzymatique.

## **I.1 Les polyphénoloxydases**

### **I.1.1 Les réactions catalysées**

Les polyphénoloxydases sont des métalloprotéines à cuivre qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire. La classification adoptée par la Commission Enzymes de l'IUB (International Union of Biochemistry) comporte 3 types d'enzymes qui, toutes, ont comme substrat oxydant l'oxygène moléculaire (Figure 1) :

- Les monophénols oxydases (EC 1.14.18.1) ou crésolases qui catalysent l'oxydation des monophénols en *o*-diphénols (réaction d'hydroxylation) puis la déshydrogénation de ces derniers en *o*-quinones,
- Les *o*-diphénolases (EC 1.10.3.1) nommées également catécholases qui catalysent l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones,
- Les *p*-diphénolases (EC 1.10.3.2) nommées également laccases qui catalysent l'oxydation aussi bien les *o*-diphénols que les *p*-diphénols en leurs quinones correspondantes.

Les réactions présentées **figure 1** montrent que pour la première enzyme (EC 1.14.18.1), l'oxydation d'une mole de monophénol consomme une mole d'oxygène pour former une

mole de quinone alors que pour les 2 dernières (EC 1.10.3.1 et EC 1.10.3.2), une demi-mole d'oxygène est consommée par mole de diphénol pour produire une mole de quinone.

Pour toutes ces activités enzymatiques, présentes dans la plupart des végétaux et dans de nombreux microorganismes, le terme général de polyphénoloxydase (PPO) est employé. Chez les végétaux supérieurs, ces enzymes catalysent principalement des réactions de type catécholoxydase. *In vivo*, les PPO seraient impliquées dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes. Chez les moisissures et champignons, on retrouve principalement les laccases, responsables de la dégradation de la lignine. Ces dernières sont peu présentes dans les fruits et légumes, mis à part dans la pêche (Harel *et al.*, 1970) et l'abricot (Dijkstra et Walker, 1991) et ne seront par conséquent pas étudiées dans ce travail. Ainsi, nous nous intéresserons dans cette étude exclusivement à l'activité catécholoxydase de la PPO extraite de pomme.

### **I.1.2 Localisation**

La PPO est présente dans les différents organes des végétaux supérieurs (racine, graine, feuille, peau et cortex du fruit). Cette localisation dépend de l'espèce mais aussi du degré de maturité (Vamos-Vigyazo, 1981 ; Janovitz-Klapp, 1989 ; Macheix *et al.*, 1990). En ce qui concerne la localisation intracellulaire, des études cytochimiques réalisées sur des cellules de pomme ont montré que la PPO est présente essentiellement dans les membranes plastidiales (Murata *et al.*, 1997). C'est à la suite d'une décompartmentation cellulaire, provoquée notamment par des processus technologiques (découpe, broyage), que se produit le contact PPO / phénol conduisant ainsi au brunissement enzymatique des fruits et légumes en présence d'oxygène.

L'activité PPO fluctue selon la maturité des fruits et légumes. Elle est maximale au premier stade de développement. Le changement d'activité est accompagné par une modification de solubilité de la PPO. Dans le cas de la pomme, l'activité PPO diminue lors de la maturation du fruit (Janovitz-Klapp, 1989 ; Murata *et al.*, 1997). Ces auteurs associent cette observation au passage, en fin de maturation, d'une forme liée de la PPO à la membrane chloroplastique initialement présente dans le fruit immature, à une forme libre.

### I. 1. 3. Structure et mécanismes réactionnels

Les premiers travaux sur les propriétés des PPO, notamment sur leur structure, ont été réalisés sur des enzymes d'origine fongique et ont été par la suite élargis à de multiples sources, en particulier les champignons de Paris (Wilcox *et al.*, 1985 ; Solomon *et al.*, 1996 ; Billaud *et al.*, 2002 ; Chen et Kubo, 2002), la pomme (Janovitz-Klapp, 1989 ; Nicolas *et al.*, 1994 ; Rocha et Morais, 2001) ou encore la poire (Espin *et al.*, 1998).

Les polyphénoloxydases sont des métallo-enzymes à cuivre comportant une à plusieurs chaînes polypeptidiques selon leur origine. Dans de nombreux cas, il a été mis en évidence la présence de deux atomes de cuivre par chaîne associés à des résidus histidine par des liaisons de coordinance.

Des modèles structurels du site actif ont été proposés, notamment par Solomon *et al.* (1996) et Espin *et al.* (1998). Ces derniers ont mis en évidence la présence de différents états fonctionnels de l'enzyme permettant d'expliquer le mécanisme réactionnel impliquant l'hydroxylation des monophénols (activité crésolase) et la déshydrogénation des *o*-diphénols (activité catécholase) des PPO. L'activité des PPO est basée sur le changement de la valence du métal. Ainsi, les deux atomes de cuivre du site actif passent alternativement de l'état cuivrique à l'état cuivreux au cours de la catalyse et peuvent exister sous trois formes différentes appelées *met*, *oxy* et *deoxy* (Lerch, 1981 ; Espin *et al.*, 1998).

*In vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme *met* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ ), incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes *et al.* (2002). Les formes *oxy* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ ) peuvent réagir avec les mono- et les di-phénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols. Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992).

Cependant, la forme *oxy* semble instable, ce qui réduit fortement l'activité des PPO vis-à-vis des mono-phénols (Eicken *et al.*, 1999). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990).

Pour les laccases, le mécanisme est différent puisqu'il s'agit d'un mécanisme ping-pong avec formation de radicaux semi-quinones et d'eau. Par la suite, il y a soit dismutation de deux semi-quinones pour donner une quinone et le phénol d'origine soit dimérisation pour donner un dimère phénolique.

### I.1.4 Spécificité

La spécificité des PPO vis-à-vis des substrats phénoliques a été largement étudiée. Des différences de paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_m$ ) liées à la source d'enzyme, aux conditions expérimentales et à la pureté de l'enzyme ont été observées (Vamos-Vigyazo, 1981 ; Nicolas *et al.*, 1994). Elles dépendent aussi de la structure quaternaire des PPO (Whitaker et Martinez, 1995). Zawistowski *et al.* (1991) ont observé que les formes agrégées de la PPO de topinambour présentent les deux activités monophénolase et *o*-dihydroxyphénolase alors que les sous unités de faibles poids moléculaires sont spécifiques uniquement des *o*-diphénols. L'affinité des PPO va dépendre également des réactions secondaires susceptibles de se produire lors de l'extraction et de la purification telles que la formation de liaisons covalentes avec les quinones ou bien des réactions de protéolyse (Mayer et Harel, 1991).

Les substrats phénoliques de la PPO présents naturellement dans les fruits et légumes sont principalement les catéchines, les dérivés estérifiés des acides hydroxycinnamiques (comme l'acide chlorogénique), la 3,4 dihydroxyphénylalanine (DOPA) et la tyrosine. Le type et la position des substituants sur le cycle aromatique sont déterminants pour la réactivité du substrat (Zawistowski *et al.*, 1991). Ainsi les monophénols sont hydroxylés si le groupement substitué est en position *para* de la fonction hydroxyl. Lors d'une étude effectuée sur la PPO de pomme, Janovitz-Klapp (1989) a montré que, par rapport au 4-méthylcatéchol (substrat couramment utilisé pour la mesure d'activité des PPO), la présence d'un groupement carboxylique en *para* de la fonction hydroxyl (acide *o*-dihydroxybenzoïque) ou conjugué au cycle aromatique par une double liaison (acide caféique) augmentait l'affinité d l'enzyme pour son substrat *o*-diphénolique, tout en diminuant la valeur de  $V_m$ .

Lorsque cette fonction carboxylique est estérifiée (acide chlorogénique) ou éloignée du cycle par l'interposition de groupements  $CH_2$  (acides *o*-dihydroxy-phénylacétique et phénylpropionique), une augmentation simultanée des valeurs de  $K_m$  et de  $V_m$  est observée. Les valeurs de  $K_m$  vis-à-vis des composés *o*-diphénoliques sont pour la plupart comprises entre 0,5 et 10 mM pour la PPO de pomme (Janovitz-Klapp, 1989).

Selon les travaux de Rivas et Whitaker (1973), Golbeck et Cammarata (1981), Janovitz-Klapp *et al.* (1990) et Heimdal et Rasmus (1997), les valeurs de  $K_m$  des PPO vis-à-vis de l'oxygène sont comprises entre 0,1 et 0,5 mM pour les PPO de poire, d'épinard, de pomme et de laitue respectivement. Ainsi, il apparaît que dans les solutions aqueuses saturées

en air à 20-30 °C (conditions fréquemment utilisées pour le dosage des PPO), la concentration en oxygène dissous étant comprise entre 0,3 et 0,2 mM, la PPO n'est pas en conditions saturantes vis-à-vis de l'oxygène. Il en résulte que les conditions de saturation en air doivent être soigneusement contrôlées pour tenir compte de variations éventuelles dans les concentrations initiales en oxygène dissous lors des dosages d'activité.

### **I.1.5 Effets du pH et de la température**

Le pH optimal d'activité varie dans une large gamme comprise entre pH 4 et pH 7 selon l'origine de la PPO ainsi que le substrat utilisé (Vamos-Vigyazo, 1981). Il est proche de 4,5 pour les PPO de pomme (Walker et Ferrar, 1995 ; Janovitz-Klapp, 1989 ; Zhou *et al.*, 1993), d'olive (Ben-Shalom *et al.*, 1977) et de poire utilisant le 4-méthylcatéchol comme substrat. Signalons que pour la pomme, Harel *et al.* (1964) ont observé 2 maxima d'activité à pH 5,1 pour les PPO extraites à partir de chloroplastes et l'autre à pH 7 pour celles extraites à partir de mitochondries. Par ailleurs, Marques *et al.* (1995) observent également pour l'enzyme native, un optimum proche de pH 4,5.

Bien que les variations soient notées d'une espèce à l'autre et d'une isoforme à l'autre, les PPO sont considérées comme des enzymes relativement thermosensibles, contrairement aux peroxydases (Vamos-Vigyazo, 1981). En conséquence l'activité PPO résiduelle est rarement utilisée comme mesure de l'efficacité des traitements de blanchiment des produits végétaux (Williams *et al.*, 1986). Des traitements de courte durée, de l'ordre de quelques minutes, sont généralement suffisants à des températures comprises entre 70 et 90 °C, pour détruire la totalité de l'activité PPO des végétaux (Vamos-Vigyazo, 1981). Signalons enfin que la stabilité thermique des PPO décroît lorsque le pH diminue (Nicolas *et al.*, 1994).

### **I.2 Contrôle du brunissement enzymatique**

De nombreux paramètres influencent le brunissement enzymatique dans les fruits et légumes. Il s'agit de la nature et la concentration en composés phénoliques, de la concentration en enzymes, du pH et de l'activité de l'eau ( $A_w$ ). La PPO étant relativement thermosensible, la température joue également un rôle important, et enfin il ne faut pas oublier le deuxième substrat de cette enzyme, l'oxygène dont la disponibilité dans le végétal influence fortement la réaction. Tous ces facteurs sont à prendre en compte dans la prévention du brunissement enzymatique.

Dans l'industrie alimentaire, les sulfites et ses dérivés sont depuis longtemps considérés comme étant le moyen le plus efficace et le moins coûteux pour contrôler le brunissement enzymatique. D'une part, ils dénaturent la PPO de façon irréversible (Golan-Goldhirsh et Whitaker, 1984) et d'autre part, ils agissent sur les produits de la réaction et empêchent la formation de pigments. Cependant, en raison des effets secondaires indésirables sur la santé, notamment chez les asthmatiques, leur emploi tend à disparaître au profit d'autres méthodes (Mc Evily *et al.*, 1992).

Plusieurs traitements physico-chimiques sont à la disposition des technologues afin d'empêcher ou de limiter le développement du brunissement enzymatique (Sapers, 1993 ; Walker et Ferrar, 1995). Ce contrôle du brunissement enzymatique peut être envisagé à 3 niveaux suivant que la cible principale est constituée par l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction.

Certains traitements sont très efficaces pour réduire l'activité PPO soit en dénaturant l'enzyme soit en l'inhibant. Par exemple, un traitement thermique approprié permet de dénaturer la PPO de façon efficace (Vamos-Vigyazo, 1981), mais ce procédé n'est pas compatible avec des produits frais. Par ailleurs, on distingue les composés qui agissent sur le cuivre de l'enzyme tels que les halogénures (NaCl) et ceux qui affectent le site actif de l'enzyme. Parmi cette seconde catégorie, nous pouvons citer les acides carboxyliques aromatiques des séries benzoïques et cinnamiques sur lesquels de nombreux travaux ont été réalisés. Ces composés sont le plus souvent des inhibiteurs compétitifs des PPO (Mayer et Harel, 1979 ; Nicolas *et al.*, 1994).

Ces moyens sont plus ou moins efficaces et dépendent de l'origine de la PPO. Par exemple, le 4-hexylrésorcinol (ou ses dérivés), largement employé pour inhiber le brunissement des crevettes (Mc.Evily *et al.*, 1992) (**Tableau I**) et des tranches de champignon (Jimenez et Garcia-Carmona, 1997) n'a qu'une action partielle sur les tranches de pomme et les raisins (Monsalve *et al.*, 1993 ; Martinez et Whitaker, 1995).

D'autres techniques également très efficaces peuvent être utilisées, mais elles présentent cependant des limites organoleptiques. Tel est le cas de l'emploi d'acide citrique (acidification), du bicarbonate de sodium (alcalinisation) ou encore des thiols (cystéine et glutathion), ces derniers interagissant avec les produits de la réaction pour former des produits d'addition incolores (**Figure 2**). Toutefois, ces composés d'addition peuvent également entrer

dans des réactions d'oxydations couplées avec les *o*-quinones en excès conduisant, d'une part au phénol parental et d'autre part à la formation de produits fortement colorés (Richard-Forget *et al.*, 1992). Selon Nappi et Vass (1994), la cystéine serait capable d'inhiber l'activité monophénolasique de la tyrosinase de champignon.

Un autre agent réducteur largement utilisé dans l'industrie pour contrôler ce phénomène est l'acide ascorbique. Cet antioxydant naturel régénère les *o*-diphénols en réduisant les *o*-quinones formées (Varoquaux et Sarris, 1979 ; Nicolas *et al.*, 1994 ; Walker et Ferrar, 1995 ; Martinez et Whitaker, 1995). Cependant, son effet anti-brunissement n'est que temporaire (Varoquaux et Sarris, 1979 ; Golan-Goldhirsh et Whitaker, 1984). Ces propriétés et son utilisation industrielle seront développées dans un prochain chapitre. Les travaux de Golan-Goldhirsh et Whitaker (1984) montrent les effets inhibiteurs de l'acide ascorbique, du bisulfite de sodium et des composés thiols sur l'activité de la tyrosinase de champignon.

Enfin, la lutte contre le brunissement enzymatique peut être envisagée en piégeant les substrats de la PPO (polyphénols ou oxygène). L'utilisation de cyclodextrines, composés relativement coûteux, permet de piéger les polyphénols par complexation dans leur cavité et les rend inaccessibles pour la PPO (Sapers *et al.*, 1989 ; Billaud *et al.*, 1995).

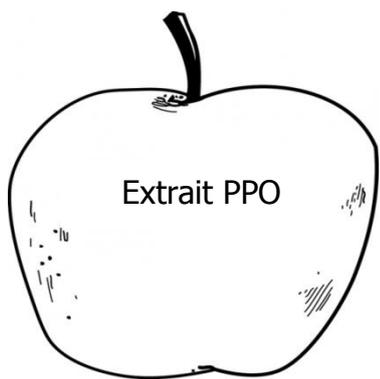
Citons également l'acide kojique, l'acide oxalique et la tropolone qui, outre leur pouvoir chélateur de métaux, sont des inhibiteurs compétitifs ou mixtes des PPO (Kahn et Andrawis, 1985 ; Kahn *et al.*, 1995 ; Espin et Wichers, 1999).

## **II. De la pomme à la purée**

### **II.1 Caractérisation de la pomme**

La pomme est l'un des fruits les plus fréquemment consommés. L'Europe produit 7,5 millions de tonnes de pommes chaque année (dont 2 millions en [France](#)). [Golden](#) (40 %), [Gala](#) (15 %) et [Granny Smith](#) (10 %) sont les variétés les plus répandues en France. Leur couleur, leur fermeté et leur saveur sont variables. Les pommes constituent une partie importante de l'alimentation humaine, et sont une source d'oses, minéraux, fibres alimentaires, de divers composés biologiquement actifs et de certains composés phénoliques qui sont connus pour agir comme antioxydants naturels. Certains chercheurs ont également envisagé la capacité des polyphénols à être des composés anticancéreux et antimutagènes (Lee et Mattick, 1989 ; Miller et Rice-Evans, 1997).

Pour la suite de ces travaux, la composition du modèle produit sera basée sur celle du projet Tempantiox et issue de travaux sur la pomme. Elle est présentée dans la **Figure 3**.



		Concentration	
		g/L	mol/L
<b>Paroi Cellulaire</b>		5	-
<b>Polyphénols</b>	<b>Catéchine</b>	0,1	$3,44 \times 10^{-4}$
	<b>Acide chlorogénique</b>	0,2	$5,64 \times 10^{-4}$
<b>Procyanidines</b>		0,5	f(DP)
<b>Vitamine C (ajoutée par pulvérisation)</b>		1	$5,67 \times 10^{-3}$

**Fig.3 : Composition du milieu modèle issu du projet TEMPANTIOX**

Les composants des parois cellulaires, la (-)-épicatéchine (EPI), l'acide chlorogénique (CG) et les procyanidines sont des composés endogènes aux pommes tandis que la vitamine C est majoritairement ajoutée. Un paragraphe sera consacré à chacun d'entre eux dans la suite de ce chapitre.

Le pH moyen des pommes varie entre 2,8 et 7. Celui de la Golden Delicious est de 3,8. Cette variété étant celle utilisée le plus souvent pour la production de compotes, nous choisirons logiquement cette valeur pour fixer le pH de nos différents milieux modèles. Les pommes sont constituées d'un grand nombre d'acides organiques tels que les acides quinique, citrique, succinique et malique. Ce dernier est l'acide organique majoritaire.

Les concentrations en sucres solubles des moûts de pomme constituent un critère majeur de la qualité cidrière des pommes. Les principaux sucres solubles présents dans la pomme sont le fructose à 51 %, le glucose à 26 % et le saccharose à 22 % en moyenne (Ackermann *et al.*, 1992).

Différentes données représentant les teneurs moyennes des différents constituants de plusieurs variétés de pomme sont présentées dans le **tableau II**.

## **II.2 Les composés phénoliques**

Les polyphénols forment un groupe de composés très divers et se différenciant par le nombre et l'enchaînement des noyaux aromatiques, le nombre et la position des fonctions hydroxyles ainsi que par la présence de substituants non phénoliques de nature diverse. Dans la pomme, ils se divisent en deux grands groupes : les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes.

Les acides hydroxycinnamiques rencontrés dans la pomme sont principalement les acides caféique et *para*-coumarique tous deux estérifiés par de l'acide quinique pour former l'acide 5'-caféoylquinique ou l'acide chlorogénique (CG), majoritaire, et l'acide *para*-coumaroylquinique (Guyot *et al.*, 1998 ; Sanoner *et al.*, 1999 ; Awad et Jager, 2000). Ils représentent 9 à 39 % des polyphénols totaux de la pomme.

Parmi les flavan-3-ols, seules les catéchines monomères et polymères (procyanidols) sont présentes dans la pomme. Les monomères de catéchines sont majoritairement représentés par la (-)-épicatéchine (EPI), puis par la (+) catéchine (Guyot *et al.*, 1998 et 2002 ; Sanoner *et al.*, 1999). Ces monomères peuvent représenter jusqu'à 24 % des polyphénols totaux.

Les polymères de flavan-3-ols (procyanidols) sont constitués, dans la pomme, d'une unité terminale de (-) épicatéchine ou de (+) catéchine et de une ou plusieurs unités d'extension de (-) épicatéchine exclusivement. Les unités catéchines sont reliées par une seule liaison interflavanique (procyanidols de type B). Les polymères se distinguent donc entre eux par la nature de leur unité terminale et par le nombre d'unités d'extension (degré de polymérisation). Ils constituent la classe de polyphénols la plus représentée dans la pomme (44 à 88 % des polyphénols totaux) aussi bien pour la pomme à cidre (Guyot *et al.*, 1998) que pour la pomme à couteau (Guyot *et al.*, 2002). Ils ont un rôle important concernant les caractéristiques de goût, tels que l'amertume et l'astringence, et aussi de couleur (Miller et Rice-Evans, 1997). La concentration de ces composés phénoliques, qui est fortement dépendante de la variété de pommes et de leur maturité, est étroitement associée aux qualités nutritionnelles et sensorielles des fruits. De faibles concentrations peuvent protéger les pommes de l'oxydation, de la détérioration, par exemple lors de la production de jus ou de

compote. Des concentrations élevées en composés phénoliques et leurs produits d'oxydation peuvent entraîner une coloration non voulue des produits du fruit avec formation d'une couleur brune dans les jus, à la suite de l'interaction entre les procyanidines (tannins condensés) et les protéines, les glucides ou encore les minéraux (Ayaz *et al.*, 1997).

La sensibilité des pommes au brunissement dépend de la concentration relative des différents groupes de composés phénoliques. Les plus réactifs sont d'une part les catéchines d'autre part particulièrement les acides chlorogénique et caféique (Amiot *et al.*, 1992; Perez-Illarbe *et al.*, 1991). Les composés phénoliques, et en particulier les flavanols, semblent être importants pour la classification des différentes cultures de pomme en groupes, ainsi que par rapport à leurs utilisations.

Pour la production de cidre, les pommes avec un fort contenu phénolique sont préférées, tandis que pour les jus naturellement troubles un faible niveau de composés phénoliques est nécessaire.

Les pommes liées à la consommation directe doivent être riches en composés biologiquement actifs, tels que l'acide ascorbique, les composés phénoliques et en particulier les flavanols, les catéchines et les procyanidines. En outre, les acides aminés libres et les acides gras, qui sont des éléments nutritifs de nombreux fruits et légumes jouent également un rôle important dans la santé humaine et le maintien de la qualité des fruits (Schieber *et al.*, 2001).

Les composés phénoliques présentant un groupement ortho-diphénolique sont facilement oxydés par les polyphénoloxydases. Les principaux substrats naturels des PPO dans les organes végétaux (fruits et légumes) sont les catéchines et les dérivés hydroxycinnamiques, plus particulièrement les dérivés caféiques comme l'acide chlorogénique (Macheix *et al.*, 1990). La formation des produits colorés qui caractérisent le brunissement se fait en deux étapes : une étape enzymatique conduisant aux *o*-quinones et une étape non enzymatique aboutissant par polymérisation et condensation des quinones aux « complexes bruns ». Les travaux de ces dernières années ont montré la complexité de cette deuxième étape, avec notamment l'intervention de mécanismes d'oxydations couplées permettant d'expliquer que des composés phénoliques qui ne sont pas des substrats de la PPO (ou sont peu oxydés directement par l'enzyme) puissent être néanmoins dégradés lors du phénomène de brunissement (Cheynier *et al.*, 1989 ; Nicolas *et al.*, 1994).

De nombreux travaux ont été consacrés à la spécificité des PPO vis-à-vis des substrats phénoliques. Cette spécificité dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales (Van Gelder *et al.*, 1997).

Connaissant l'affinité du CG et de l'EPI pour la PPO ( $V_m$  et  $K_m$ ), la suite des travaux va s'attacher à déterminer leurs interactions dans des conditions expérimentales définies (pH, température, concentration en  $O_2$ , concentration en CG et EPI). L'interaction entre les polyphénols du fruit et la PPO modifie de façon importante les qualités nutritionnelles et organoleptiques des pommes. Il est donc essentiel de connaître et de comprendre les réactions enzymatiques en détail afin de maîtriser ce phénomène de brunissement.

En présence d'EPI et de CG, il y a un phénomène d'oxydation couplée entre l'EPI et les *o*-quinones de CG pour redonner CG et accroître la formation de quinones d'EPI. Par ailleurs, les *o*-quinones très instables sont susceptibles de réagir à nouveau avec les phénols non oxydés pour donner des dimères du polyphénol original (ou des codimères), qui peuvent à leur tour être oxydés et donner des oligomères plus ou moins colorés (**Figure 4**).

### **II.3 Les procyanidines**

Les procyanidines sont particulièrement abondantes dans l'alimentation humaine par l'intermédiaire des fruits et elles contribuent simultanément aux qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments (Rasmussen *et al.*, 2005).

Elles sont responsables de la sensation d'astringence (assèchement de la muqueuse buccale) en interagissant avec des protéines salivaires (Green, 1993). Elles sont également responsables d'effets antinutritionnels attribués à leur capacité à interagir avec les enzymes digestives (McDougall et Stewart, 2005). L'inhibition des enzymes digestives lors de l'interaction avec les procyanidines a été prouvée pour les lipases (Moreno *et al.*, 2003), les protéases (Gonçalves *et al.*, 2007), ainsi que les glucosidases (McDougall *et al.*, 2005) parmi lesquelles les  $\alpha$ -glucosidases sont un groupe d'enzymes qui hydrolysent les oligosides (Funke et Melzig, 2005).

L'interaction des procyanidines avec les protéines a été étudiée en utilisant plusieurs approches techniques (Baxter *et al.*, 1997; Hagerman et Butler, 1981; Mateus *et al.*, 2003; Mueller-Harvey *et al.*, 2007; Papadopoulou *et al.*, 2005). Les connaissances actuelles indiquent que cette interaction est affectée par des caractéristiques de la protéine (taille moléculaire, hydrophobicité et flexibilité structurelle) et du polyphénol (degré de polymérisation, étendue de la galloylation et

flexibilité structurelle) et par l'environnement (température, pH, force ionique, présence de solvants organiques et glucides) (Carvalho *et al.*, 2006).

Les procyanidines sont les composés phénoliques les plus abondants dans les pommes de table et les pommes à cidre. Les procyanidines sont des tanins condensés qui contribuent aux propriétés organoleptiques du cidre, en particulier par leur astringence et leur amertume. Dans la pomme, ils sont constitués d'oligomères ou de polymères d'unités de catéchine, avec plus de 95 % de (-) épicatechine, le plus souvent liées les unes aux autres par des liaisons C4 → C8 ou C4 → C6. Ce sont des procyanidines de type B (Shoji *et al.*, 2003).

La taille moyenne de ces oligomères ou des polymères à maturité est une caractéristique variétale (Sanoner *et al.*, 1999 ; Guyot *et al.*, 2002 ; Alonso-Salces *et al.*, 2005) qui varie peu avec la maturité, le mode de culture, la récolte de l'année ou la durée de stockage (Guyot *et al.*, 2002 et 2003). Les propriétés organoleptiques des procyanidines sont étroitement liées à leur degré de polymérisation (DP).

Les procyanidines avec les DP les plus élevés (DP > 6-8) sont principalement astringentes tandis que les plus petits oligomères sont principalement amers (Lea et Arnold, 1978 ; Vidal *et al.*, 2003).

Récemment, dimères, trimères et oligomères de procyanidines ont attiré l'attention dans les domaines de la pharmacologie et de la chimie alimentaire en raison de leur effet bénéfique sur le système circulatoire ainsi que leur capacité de piègeurs de radicaux libres. Leurs activités physiologiques, comme anti-allergiques, antibiotiques et une activité inhibitrice vis-à-vis des enzymes et des récepteurs ont également été signalées (Shibusawa *et al.*, 2000) (**figure 5**). Ces propriétés des procyanidines dépendraient du degré de polymérisation de la catéchine et / ou l'épicatechine.

Outre les procyanidines, les dérivés des acides hydroxycinnamiques et les monomères de flavan-3-ols, la pomme contient des dihydrochalcones, des flavonols et des anthocyanes comme autres polyphénols. Ces deux derniers polyphénols se trouvent presque exclusivement dans l'épiderme (Nicolas *et al.*, 1994).

#### **II.4 Les composants des parois cellulaires**

Dans la chair de la plupart des fruits, environ 50 % (p / p) de la matière sèche sont composés de cellulose et d'hémicelluloses, elles-mêmes imbriquées dans un réseau pectique

qui constitue 25 à 40 % (p / p) de la matière sèche. Le tout est interconnecté grâce à un réseau de glycoprotéines.

Les polyphénols se trouvent en grande majorité dans la vacuole des cellules et ne se trouvent donc pas en contact avec la polyphénoloxydase si le fruit n'est pas lésé. En revanche, en cas de lésion du fruit, non seulement des phénomènes de brunissement enzymatique peuvent se produire, mais encore les polyphénols ainsi libérés peuvent interagir avec les polysaccharides de la paroi végétale, ce qui diminue leur extractibilité lors du pressurage des fruits destinés à la fabrication de jus ou purée à base de fruits.

Les parois cellulaires végétales peuvent se définir comme étant un complexe de polymères tels que les polysaccharides, des protéines et de la lignine reliés entre eux dans une structure rigide. Dans les tissus végétaux intacts, les composants des parois cellulaires, les polyphénols et la PPO sont présents dans des compartiments distincts.

Lorsque les cellules sont rompues, par exemple, par broyage et pressage, ces trois éléments entrent en contact. Des études ont montré les fortes interactions entre les parois cellulaires et d'autres composés de la pomme tels que les glucides (Cai *et al.*, 1990), l'adsorption des polyphénols natifs et oxydés sur la paroi cellulaire et la formation de liaisons covalentes entre les composants de cette dernière et les *o*-quinones (Renard *et al.*, 2001). L'activation de la PPO se produit uniquement lorsque ces compartiments sont perturbés après la rupture des tissus cellulaires (Mayer, 1987).

La texture est un attribut sensoriel essentiel des fruits et légumes. Les propriétés de texture sont influencées par l'arrangement des cellules du parenchyme (Devaux *et al.*, 2005; Zdunek et Umeda, 2005 et 2006), la quantité et le volume des espaces intercellulaires (Chanliaud *et al.*, 2002), la perméabilité des parois cellulaires (Pitt, 1982 ; Pitt et Chen, 1983), leur structure, leur épaisseur, leur composition chimique, le niveau de dégradation des pectines et la pression dans les cellules (Jackman et Stanley, 1995). Les parois des cellules végétales constituent le principal élément structurel affectant les propriétés mécaniques de ces matériaux (Zdunek et Konstankiewicz, 2004 ; Bourne, 2002 ; Waldron *et al.*, 2003 ; Vanstreels *et al.*, 2005). Ces propriétés mécaniques des parois cellulaires végétales évoluent naturellement pendant la maturation et sont modifiées par les opérations de transformation des aliments, entraînant habituellement un ramollissement de la matière végétale (Waldron *et al.*, 2003). Ces changements sont liés à la dégradation des pectines et, dans une moindre mesure, des hémicelluloses, alors que la quantité de cellulose dans les parois cellulaires reste constante (Voragen *et al.*, 2001 ; Kunzek *et al.*, 1999).

## **II.5 L'acide ascorbique**

Les fruits et légumes sont des sources alimentaires de vitamine C. La principale forme biologiquement active de cette vitamine est l'acide L-ascorbique (AA), son oxydation produit de l'acide L-déhydroascorbique (DHA) qui est également une forme active (Villota et Karel, 1980 ; Levine et Morita, 1985). La teneur en AA est généralement déterminée par titrage colorimétrique avec la méthode utilisant le 2,6-dichlorophénolindophénol (AOAC, 1990).

Au cours des transformations des fruits (jus de fruit, compotes) les traitements thermiques tels que le blanchiment, la pasteurisation ainsi que la déshydratation sont couramment appliqués. Ces traitements entraînent la dégradation de la vitamine C ainsi que le développement du brunissement non enzymatique (Massaioli et Haddad, 1981 ; Leistner, 1995). Ce type de brunissement est considéré comme l'une des principales causes de la perte de qualité des jus d'agrumes au cours du stockage. Il a un rôle important sur les caractéristiques organoleptiques comme le goût et la couleur, les qualités nutritionnelles des produits et est très fortement lié à la perte en vitamine C (Lee et Nagy, 1988).

La prévision de la durée de conservation des produits alimentaires stockés dans différentes conditions est un problème complexe pour l'industrie alimentaire, parce qu'elle dépend d'un grand nombre de facteurs comme la température, l'humidité relative, la pression partielle d'oxygène, la perméabilité de l'emballage aux rayons lumineux, et le type de conditionnement (Quast et Karel, 1972 ; Bissett et Berry, 1975 ; Massaioli et Haddad, 1981). En particulier, avec l'avènement de la réglementation sur l'étiquetage nutritionnel, il y a eu un intérêt considérable pour la rétention d'éléments nutritifs comme la vitamine C dans les jus d'agrumes.

Dans la pomme, l'acide ascorbique est un composé naturellement présent à faible concentration. Il est majoritairement ajouté au cours de la fabrication des jus, purées ou compotes afin d'empêcher le brunissement enzymatique due à l'action des PPO. L'action de l'acide ascorbique dans la prévention du brunissement enzymatique est de ramener les intermédiaires *o*-quinones en composés phénoliques d'origine avant que ceux-ci ne subissent d'autres réactions conduisant à la formation des pigments colorés. Parallèlement, l'AA permettant la régénération des phénols initiaux s'oxyde en DHA, il s'agit d'une réaction d'oxydation couplée (**Figure 6**). Cependant, l'efficacité de l'acide ascorbique contre le brunissement est temporaire (Nicolas *et al.*, 2003).

Lorsque tout l'acide ascorbique est consommé (transformé en DHA), les *o*-quinones s'accumulent (apparition de la coloration) et la diminution de la vitesse initiale enzymatique est seulement due à la diminution de la concentration en oxygène dissous dans le milieu liquide. Ainsi une concentration proche de 0,5 mM en composé réducteur correspond au double de la concentration en oxygène dissous (celle-ci est égale à 0,22 mM à 30 °C dans l'eau). Il n'y a donc pas inhibition de la réaction enzymatique (la consommation d'oxygène fonctionne toujours mais sans apparition de brunissement). En contrepartie, une forte concentration en acide ascorbique ajouté peut conduire à un goût désagréable sur les morceaux de pomme (Laurila *et al.*, 1998).

Rojas et Gerschenson (1997) ont montré que la dégradation de l'acide ascorbique en systèmes modèles aqueux est fortement dépendante de la concentration en oxygène dissous, de la température et du pH. Solomon *et al.* (1995) ont étudié l'effet de l'oxygène sur la dégradation de l'AA et ont montré que la formation du DHA augmentait avec la concentration en oxygène dissous dans le milieu. La destruction de l'AA dans ces conditions aérobies (oxydation) est souvent catalysée par des ions métalliques (cuivre, argent, fer et étain) (Bissett et Berry, 1975). Par ailleurs, une dégradation thermique en conditions anaérobies peut se produire simultanément, même si elle reste néanmoins plus lente que la dégradation aérobie de l'AA (Kurata et Sakurai, 1967).

L'augmentation de température réduit de manière significative la vitesse de réaction d'oxydation de l'acide ascorbique, probablement en raison de la diminution des concentrations en oxygène dissous à haute température (Assiry *et al.*, 2006). Il a été également montré que la cinétique de dégradation thermique de l'acide ascorbique peut être décrite par un modèle du premier ordre.

La valeur de pH du milieu réactionnel est aussi un facteur influençant le plus la vitesse de dégradation de AA. Il a été signalé que la dégradation dans des conditions anaérobies atteint un maximum à une valeur de pH de 4,1, qui correspond au  $pK_1$  de l'acide ascorbique (Lee *et al.*, 1977). Eison-Perchonok et Downes (1982) ont rapporté que l'oxydation de l'acide ascorbique à pH 6,1 était dépendante de la concentration d'oxygène dissous.

## **II.6 L'acide déhydroascorbique**

L'acide déhydroascorbique (DHA), (CAS 490-83-5), est la forme oxydée réversible de l'acide ascorbique (**Figure 7**). Les deux formes DHA et AA sont des composés importants dans l'alimentation. Plusieurs propriétés distinguent le DHA de l'AA. Le premier est plus

réactif et instable en solution que l'AA. Il peut être réduit en AA ou facilement hydrolysé de façon irréversible en acide dicétogulonique. Il a clairement un rôle biologique différent de l'AA dans les systèmes de culture cellulaire (Deutsch, 1998).

Les propriétés oxydantes du DHA ont été largement étudiées pour leurs applications en technologie des céréales (Kaïd *et al.*, 1997). Lors du pétrissage des pâtes de farine de blé supplémentées en AA, ce dernier est oxydé en DHA par une AA oxydase présente dans la farine.

En présence des groupements thiols contenus dans le glutathion et les protéines du gluten, le DHA ainsi formé est rapidement réduit en AA avec formation de ponts disulfures expliquant du même coup l'effet améliorant de l'AA sur les propriétés boulangères des farines de blé. Par ailleurs, des études sur des systèmes modèles contenant du DHA et des protéines ont montré que le DHA pouvait aussi réticuler des protéines, à 37 °C, par des mécanismes qui n'impliquent pas la formation de ponts disulfures (Fayle *et al.*, 2000). Le mécanisme serait lié à la réaction de Maillard, selon une série de réactions complexes entre les groupes carbonyles réactifs (dont ceux du DHA) et les groupes aminés libres présents dans les protéines (Maillard, 1912).

### **II.7 Les autres produits de la dégradation de l'acide ascorbique**

Les traitements thermiques et les réactions d'oxydation engendrent la dégradation de l'AA et du DHA en différents composés selon les conditions du milieu. En effet, les produits formés et leurs teneurs varient en fonction du temps et de l'intensité du traitement thermique (Rojas et Gerschenson, 1997).

L'oxydation de l'acide ascorbique en DHA est réversible, mais le plus souvent, dans l'aliment, le DHA subit une hydrolyse irréversible qui conduit à la formation de l'acide 2,3-dicétogulonique (DKG) (Moll et Moll, 1998). Dans des conditions de stress oxydatif, le DHA, après avoir été hydrolysé en DKG, se dégrade rapidement en espèces comportant de 5 à 4 atomes de carbone. Il subit en solution aqueuse, une décarboxylation et une déshydratation pour donner naissance au 3-hydroxy-2-pyrone et à l'acide 2-furoïque.

En conditions anaérobies, l'acide ascorbique peut aussi se dégrader à la suite d'un traitement thermique d'autant plus facilement que le milieu est acide. Il subit alors des étapes

d'hydrolyse, de décarboxylation et de déshydratation qui conduisent à la formation de CO<sub>2</sub> et de furfural. Cette dégradation anaérobie est observée dans les jus de fruits acides tels que le jus de citron ou même le jus d'orange conditionnés en bouteilles en verre et / ou en boîtes métalliques hermétiquement fermées. Robertson et Samaniego (1986) ont suggéré que, puisque la formation de furfural n'est pas significativement affectée par les niveaux initiaux d'oxygène dissous, l'anaérobie peut se présenter comme la principale voie de formation de furfural à partir de l'acide ascorbique dans le jus de citron.

Dans le cas où de l'oxygène se trouve encore présent dans le col des bouteilles qui ont été fermées, on observe tout d'abord une dégradation de l'acide ascorbique par oxydation, puis une dégradation lente anaérobie (**Figure 8**) (Shinoda *et al.*, 2005). La dégradation aérobie est environ 10 fois plus rapide que la dégradation anaérobie. Le pH influence également la dégradation de l'AA comme l'ont montré Van den Broeck *et al.* (1998). Le taux d'oxygène du milieu a aussi un impact sur la nature et la quantité des produits formés à partir de l'AA. Des conditions de pH acide ont favorisé la formation du furfural, de l'acide 2-furoïque, et du 3-hydroxy-2-pyrone. A un pH très acide (pH 1), la formation de furfural est dominante. Dans une solution aqueuse alcaline (pH 10), on ne retrouve qu'une très petite quantité de furfural et de 3-hydroxy-2-pyrone sans aucune trace d'acide 2-furoïque. Ces résultats suggèrent que dans un environnement acide, la dégradation de l'acide ascorbique en furfural est la voie majoritaire (Yuan et Feng, 1998).

Kanner *et al.* (1982) ont montré qu'il pourrait y avoir une relation entre le brunissement du jus d'orange et la concentration en furfural et 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) qui est un dérivé issu de la caramélisation d'ose réducteur, en particulier le glucose et/ou le fructose. En effet, le furfural et le 5-HMF pourraient contribuer au brunissement par l'intermédiaire de leur groupement carbonyle réagissant avec un groupement amine (Kacem *et al.*, 1987). Cette réaction pourrait être un indicateur du brunissement du jus d'orange (Shinoda *et al.*, 2005).

### **III. Procédés de fabrication de la purée de pommes**

#### **III.1 Généralités sur les traitements thermiques**

Les demandes des consommateurs pour des aliments sains, peu transformés ayant de bonnes qualités organoleptiques ont encouragé l'industrie alimentaire et les chercheurs

universitaires à élaborer des méthodes innovantes de transformation des aliments. La tendance est d'accepter une durée de conservation plus faible qu'auparavant mais de se diriger vers un produit plus *vrai*, plus *frais*, plus *naturel* et plus ressemblant à celui cueilli dans le jardin avec ses avantages organoleptiques, sans traitements à base d'additifs.

Actuellement, les procédés technologiques traditionnels, pasteurisation ou stérilisation suivie d'emballage et réfrigération ou congélation) ne répondent pas à cette nouvelle demande. En effet, ces types de procédés qui peuvent faire appel à des températures allant de 60 à plus de 120 °C pour des temps de traitement de quelques minutes provoquent la dénaturation d'une partie des protéines et de certaines vitamines.

Les méthodes non-thermiques pour la conservation des aliments se positionnent donc comme alternatives aux méthodes traditionnelles. Plusieurs travaux ont permis d'évaluer leurs potentialités comme processus complémentaire ou alternatif aux méthodes thermiques traditionnelles.

Actuellement, le procédé classique de fabrication de la purée de pommes comprend généralement deux ou trois étapes de chauffage. Ces traitements thermiques sont effectués à différentes températures : quelques minutes entre 70 et 98 °C pendant la fabrication, puis quelques secondes à 85 °C au cours d'un réchauffage (procédés Hot Break et Cold break) (**Figure 9**). On observe également que pour le procédé industriel « Conserve France », il y a, en plus de la pasteurisation, une étape finale de stérilisation à 115 °C pendant 35,5 s. Il est important de noter que pour ces procédés, l'ajout de l'acide ascorbique s'effectue en amont des étapes de broyage et des traitements thermiques.

### **III.2 Traitements innovants**

La demande actuelle des consommateurs s'oriente de plus en plus vers des produits alimentaires ayant les caractéristiques suivantes :

- Durée de conservation relativement longue, variant de une à trois semaines. Ces durées dépendent de la fréquence des achats.
- Produits aussi proches que possible des produits frais.
- Produits rapides à préparer.

A l'heure actuelle pour répondre à cette préoccupation, les industriels du secteur, utilisent principalement des procédés thermiques, dont les inconvénients sont connus et significatifs : dégradation des propriétés sensorielles, pertes de certaines propriétés nutritionnelles (protéines et acides aminés essentiels, vitamine C, polyphénols), altération irréversible de la fonctionnalité de certaines molécules. Tous ces inconvénients entraînent des différences qualitatives importantes entre les produits frais et les produits transformés.

Des traitements alternatifs innovants thermiques ou non existent actuellement. Ils permettent de pasteuriser ou stériliser les produits sans dégrader leurs caractéristiques intrinsèques. Il s'agit du chauffage ohmique, des champs électriques pulsés et notamment des ultrasons. Ces nouvelles technologies font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches à la fois fondamentales et appliquées.

### **III.2.1 Le chauffage ohmique**

Le chauffage ohmique est une technologie en développement avec un potentiel considérable pour l'industrie alimentaire. Les principaux avantages du traitement ohmique sont le chauffage rapide et relativement uniforme obtenu par effet Joule, d'un coût moyen plus faible que les autres méthodes électrothermiques telles que les micro-ondes et le chauffage à haute fréquence (champs électriques pulsés).

La technologie du chauffage ohmique a été acceptée par l'industrie pour des aliments liquides et des mélanges solide-liquide, mais pas à ce jour pour les aliments solides ayant un très faible pouvoir conducteur (Castro *et al.*, 2004 ; Piette *et al.*, 2004 ; Pataro *et al.*, 2011). Les applications de chauffage ohmique ont un fort potentiel pour se substituer à des technologies de la transformation des aliments comme le préchauffage, le blanchiment, la pasteurisation, la stérilisation, l'extraction, l'évaporation ou la déshydratation. Cette technologie a été utilisée, par exemple, pour accroître l'efficacité de l'extraction du saccharose de la betterave sucrière (Lima *et al.*, 2001) ou pour améliorer l'obtention de lait de soja à partir de soja. Ses avantages, par rapport au chauffage classique, sont notamment le maintien de la couleur et de la valeur nutritive des aliments, des délais de traitement plus courts et des rendements plus élevés (Castro *et al.*, 2004 ; Leizeron et Shimoni, 2005 ; Vikram *et al.*, 2005 ; Wang et Sastry, 2002). Comme la technologie de chauffage ohmique semble prometteuse, ses effets sur les paramètres de qualité des produits alimentaires, tels que l'inactivation de micro-organismes et

d'enzymes ou la décomposition des composés sensibles à la chaleur, commencent à être étudiés. Il y a très peu de rapports scientifiques traitant de ces aspects de chauffage ohmique et leur comparaison avec les effets de la pasteurisation classique. Castro *et al.* (2004) ont comparé la dégradation de la vitamine C dans les produits à base de fraises soumis à un chauffage ohmique ou à une pasteurisation classique. Les paramètres cinétiques obtenus étant identiques pour les deux procédés de chauffage, les auteurs ont conclu que la présence de champ électrique n'a pas d'incidence supplémentaire sur la dégradation de l'acide ascorbique.

Les champs électriques, appliqués pendant le chauffage ohmique permettent une inactivation plus rapide de la lipoxygénase et de la PPO, que lors d'un traitement thermique classique (Castro *et al.*, 2004). De même, le chauffage ohmique est plus efficace pour l'inactivation de la pectine estérase en raison d'un temps de séjour plus court, diminuant en parallèle la dégradation des composés d'arôme libérés par rapport à la pasteurisation classique (Leizeron et Shimoni, 2005). La peroxydase présente dans la purée de pois est également inactivée avec un temps de traitement plus court, si le procédé de chauffage ohmique est comparé à un traitement thermique classique (Yildiz *et al.*, 2006). En outre, le chauffage ohmique entraîne moins de phénomène de brunissement enzymatique comme le montrent les travaux réalisés par Yildiz *et al.* (2008) sur la PPO du jus de raisin.

### **III.2.2 Les Champs Electriques Pulsés**

Les champs électriques pulsés (CEP) sont depuis longtemps utilisés en génie génétique, pour l'hybridation cellulaire et l'électrofusion. Il faut attendre 1960 et le projet Doevenspeck, pour que son effet destructeur sur les microorganismes soit exploré. Sale et Hamilton furent les premiers, en 1967, à étudier l'effet bactéricide des champs électriques pulsés sur les bactéries et moisissures dans les produits d'origine végétale. Les aliments soumis à un champ électrique, ont des caractéristiques physico-chimiques qui leur sont propres et qui doivent être prises en compte afin de développer un procédé de pasteurisation efficace de ces aliments.

La résistivité des aliments est très variable, de  $0,4 \Omega \cdot m^{-1}$ , pour les aliments à forte teneur en sels et en eau, à plus de  $100 \Omega \cdot m^{-1}$ , pour les matières grasses et les huiles. Beaucoup d'aliments ont une structure hétérogène, de sorte que leurs caractéristiques électriques varient.

Ainsi la conception des installations de champs électriques pulsés doit prendre en compte ces caractéristiques électriques, selon l'usage auquel elles sont destinées.

Un phénomène particulier peut se produire lorsque l'on soumet un aliment à un CEP : c'est le claquage diélectrique. Cela résulte de la brutale modification des propriétés conductrices d'un matériau sous l'effet d'un champ électrique intense et se matérialise sous la forme d'une étincelle. Il est, là aussi, nécessaire de contrôler ce phénomène. Diverses études ont porté sur l'effet des CEP sur les constituants alimentaires. Des molécules chargées comme les protéines, certains glucides, certains lipides ou des molécules porteuses des liaisons éthyléniques pourraient subir des modifications chimiques, sous l'effet des champs électriques. Jeantet *et al.* (1999) ont étudié l'effet des CEP sur le blanc d'œuf, avec des traitements de 20 à 35 kV.cm<sup>-1</sup>, à des températures comprises entre 4 et 30 °C. Ces auteurs constatent que l'élévation de l'hydrophobicité des protéines n'est que de 1 %, pour un traitement assurant un taux de réduction de la population microbienne de 10<sup>6</sup>, alors que pour un traitement thermique ayant la même efficacité, cette élévation est proche de 60 %. La fluorescence des échantillons, observée après les traitements thermiques, ne se retrouve pas sur les échantillons traités par les CEP.

Qin *et al.*, (1995) ont effectué des analyses sensorielles sur du jus de pomme après un traitement par CEP (35-50 kV.cm<sup>-1</sup>, 10 à 32 impulsions de 2 µs, 8 à 22 °C). Aucune différence visuelle n'a été constatée par un jury, entre les produits traités par CEP et les mêmes produits pasteurisés par la chaleur, alors que le jus de pomme traité par CEP a été jugé meilleur.

Jia *et al.* (1996) ont étudié les composés aromatiques du jus d'orange soumis à un traitement de 35 kV.cm<sup>-1</sup>, pendant 200 ms. Il apparaît que 87 % des composés aromatiques ont été préservés, 15 % du limonène et 26 % de l'éthyl-butyrates ont été perdus, alors que comparativement un traitement thermique de 30 s à 91 °C réduit ces teneurs respectivement de 60 et 82 %.

### **III.2.3 Les Ultrasons**

Le son est une onde mécanique de pression qui se propage dans un milieu et qui se traduit au sein de celui-ci, par une succession de cycles de dépression et de compression. Cette onde est caractérisée par :

- sa fréquence, c'est-à-dire le nombre de cycles passant en un point fixe par unité de temps, son unité est le Hertz (Hz)
- son amplitude, qui correspond à la différence maximale entre la dépression et la compression, son unité est le mètre (m).

Les ultrasons utilisés pour leur effet bactéricide, sont situés dans une plage de fréquence allant de 20 à 100 kHz avec des intensités acoustiques supérieures à  $10^4 \text{ W.m}^{-2}$ . Les modifications constatées sur les protéines (rupture de la structure quaternaire des protéines globulaires polymériques, délipidation de certaines lipoprotéines, dissociation de l'hémoglobine, modifications de la structure de certains acides aminés), sont fortement dépendantes de la concentration de ces protéines et de la nature des gaz dissous. Parmi les enzymes, les ultrasons entraînent l'inactivation du lysozyme, des lipases, des protéases, des oxydoréductases telles que la lactate déshydrogénase. Par contre, les catalases et la ribonucléase semblent être résistantes. Le mécanisme de l'inactivation des enzymes n'est pas encore connu. Les radicaux libres produits au cours du traitement pourraient en être la cause, d'autres auteurs considèrent que les variations de pression au niveau des bulles de gaz pourraient être à l'origine de l'inactivation enzymatique (Verceta *et al.*, 2001).

## Conclusions et objectifs de recherche

Cette étude bibliographique a mis en évidence la multiplicité des facteurs intervenant dans les réactions biochimiques et thermiques qui influencent la stabilité de la PPO contenue dans les fruits et légumes.

L'étude de l'inactivation de cette oxydoréductase en milieux modèles se rapprochant d'une compote de pommes, rentre dans le cadre du projet « Tempantiox », inscrit au Programme national de recherche en alimentation et nutrition humaine Projet ANR-07-PNRA-030. Associant une approche d'ingénierie réverse ainsi que des procédés innovants, une partie de ce projet a pour objectif de proposer une nouvelle gamme de produits transformés à base de pomme présentant de nouvelles textures, organoleptiquement attractifs et riches en composés d'intérêt nutritionnel (antioxydants, fibres). Les desserts fruitiers de type purée avec morceaux ont démontré leur attractivité mais restent difficiles à produire avec les procédés classiques.

Dans le cadre du projet, les expérimentations mises en œuvre doivent permettre d'analyser le devenir de la PPO de pomme au cours du procédé de fabrication de la purée. Les cinétiques de réactions et les interactions sont étudiées *in vitro* dans des systèmes modèles mimétiques. Les variables de composition du mélange incluent des composés phénoliques, l'acide ascorbique, les parois cellulaires et la polyphénoloxydase (PPO). Le milieu réactionnel, composé au départ de solutions / suspensions des constituants étudiés d'abord individuellement puis en mélange, est progressivement complexifié jusqu'au stade de la « purée » diluée. Sur la base des résultats obtenus, un modèle stoechio-cinétique devrait pouvoir être construit, permettant de prévoir le devenir de plusieurs constituants d'intérêt (composés phénoliques simples, acide ascorbique, PPO) au cours d'une opération de traitement thermique.

## **Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **I.1 Matériel végétal, purées industrielles et commerciales**

L'ensemble de ces travaux a été réalisé à partir d'un lot homogène de pommes de la variété Marie-Ménard. Cette variété nous a été aimablement fournie par S. Guyot (Unité de recherche cidricoles URC de l'INRA de Rennes) et provient du Verger expérimental du centre technique des

productions cidricoles (Sees, Orne, France). Elle a été choisie compte tenu de sa bonne durée de conservation à 4 °C. La PPO a été extraite de ces pommes à partir du cortex du végétal.

Une étude comparative d'activité PPO a également été menée avec les variétés Golden Delicious et Red Delicious, couramment utilisées dans les milieux industriels pour leur disponibilité annuelle. De plus, la variété Red Delicious est connue pour sa richesse en activité PPO (Janovitz-Klapp, 1989 ; Richard-Forget, 1992). Une troisième variété de pomme, la Douce Cœt Ligné fournie par l'URC de Rennes a été retenue dans un certain nombre d'essais de dénaturation thermique. Compte tenu de la technique d'extraction de la PPO utilisée par cette unité de recherche, l'enzyme a la particularité d'être sous forme plastidiale (Le Bourvellec *et al.*, 2004). L'extrait de coloration vert-brun contient différents composés endogènes de la pomme (phénols natifs et / ou oxydés) et de l'acide ascorbique (natif et / ou oxydé) ajouté pendant l'étape d'extraction.

La purée de pomme utilisée dans notre étude, provient des laboratoires du Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) d'Avignon. Elle a été préparée selon le procédé de type Cold Break, conditionnée en pots de 150 g et stockée à - 20 °C afin de limiter d'éventuelles altérations des constituants. Quelques-unes de ses caractéristiques (teneurs en acide chlorogénique et en produits de dégradation de l'acide ascorbique) sont données dans le **tableau III**.

## **I.2 Préparation de l'extrait enzymatique de PPO de pomme**

Les conditions d'extraction de la PPO ont été établies afin d'obtenir un extrait enzymatique stable sous forme congelée à - 20 °C pendant plusieurs semaines. Elles sont adaptées de Janovitz-Klapp (1989).

Pour cela 100 g de cortex de pomme fraîche, rapidement découpés dans 200 mL d'une solution de tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 contenant du Triton X100 (0,5 % P / V), de l'acide ascorbique (25 mM) et du polyvinylpyrrolidone (12 % P / V), sont homogénéisés à l'aide d'un broyeur (Ultra-Turrax T 25, IKA Labortechnik) pendant trois fois 30 s à puissance maximale, avec un repos de 30 s entre chaque broyage. Après 20 min de contact à 4 °C, le broyat est centrifugé pendant

30 min à 37 800 g à l'aide d'une centrifugeuse Beckman (modèle J2-21). Le surnageant, filtré sur nylon (20 µm), constitue l'extrait brut (EB).

Deux procédés ont ensuite été mis en œuvre afin de débarrasser l'extrait brut de l'acide ascorbique incorporé pendant l'étape d'extraction de la PPO et de réduire la concentration en phénols libres : la chromatographie d'exclusion stérique et l'ultrafiltration par centrifugation.

La chromatographie d'exclusion stérique s'effectue à la température du laboratoire, sur une colonne de type PD-10 (Amersham Biosciences) contenant un gel de type Sephadex G-25 permettant la séparation des composés de haut poids moléculaires ( $M_r > 5000$ ), des composés de poids moléculaires plus faibles ( $M_r < 1000$ ). Après conditionnement de la colonne avec du tampon phosphate pH 7,2 (25 mL), 2,5 mL d'extrait brut sont déposés en tête de colonne. L'activité PPO de pomme est éluée par 3,5 mL de tampon phosphate à pH 7,2 et stockée à - 20 °C avant utilisation. Un dosage de l'activité PPO est réalisé sur cette fraction. Les composés de faibles poids moléculaires (AA, composés phénoliques libres) sont élués dans les fractions suivantes.

L'ultrafiltration par centrifugation est réalisée à partir d'une colonne Vivaspin (Sartorius VS 2001) possédant une membrane de polyéthersulfane avec un seuil de coupure de 10 000 qui permet à la solution et aux molécules de faible PM de traverser la membrane. 10 mL d'extrait brut sont déposés puis centrifugés pendant deux fois 30 min à 3000 g et à 4 °C. Le rétentat qui contient la PPO est conservé en fractions aliquotes à - 20 °C.

Au cours de cette étude, nous avons également préparé un extrait brut de PPO partiellement purifiée par chromatographie d'interactions hydrophobes sur gel de phényl sépharose CL4B selon le protocole de Janovitz-Klapp (1989), permettant ainsi d'obtenir un extrait enzymatique débarrassé protéines de haut poids moléculaire ( $PM > 45.000$ ), de ses composés phénoliques endogènes et de l'AA ajouté pendant l'étape de dialyse précédant l'étape chromatographique.

Nous avons ensuite, comparé l'activité de ces différents extraits enzymatiques, la thermosensibilité et les interactions avec d'autres composés et en particulier l'acide ascorbique.

### **I.3 Liste des réactifs**

*Extraction, purification et dosage de la PPO de pomme*

<i>Réactants</i>	<i>Qualité</i>	<i>Pureté</i>	<i>Fournisseur</i>
------------------	----------------	---------------	--------------------

<i>L-Acide ascorbique</i>		99 %	<i>Sigma</i>
<i>Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)</i>			<i>Sigma</i>
<i>Triton X100</i>			<i>Sigma</i>
<i>Dihydrogénophosphate mono-sodique</i>	<i>Rectapur</i>	89 %	<i>Merck-Eurolab</i>
<i>Hydrogénophosphate di-sodique</i>	<i>Normapur</i>	99 %	<i>VWR International</i>
<i>4-méthylcatéchol (4-MC)</i>	<i>HPLC</i>	≥ 97 %	<i>Fluka</i>

#### Milieus modèles

Réactants	Qualité	Pureté	Fournisseur
Acide malique		≥ 99 %	VWR International
NaOH		≥ 99 %	Sigma
D-Glucose		≥ 99 %	Sigma
D (-) Fructose		≥ 99 %	Sigma
D (+) Saccharose	Normapur	≥ 98 %	Prolabo
Pectine (Poly-D-acide galacturonique méthyl ester)		94 %	Sigma
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	Rectapur	≥ 99 %	Prolabo
Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> )	Normapur	≥ 99 %	Prolabo
Chlorure de potassium (KCl)	Normapur	99,50 %	Prolabo
Acide chlorogénique (CG)		≥ 95 %	Sigma
(-)-épicatéchine (EPI)			Sigma
L-Acide ascorbique (AA)		99 %	Sigma
Acide déhydroascorbique (DHA)			Sigma
3 hydroxy-2-pyrone (3H2P)		≥ 99 %	Interchim
Acide furoïque (AF)		≥ 98 %	Sigma
Fluorure de sodium (NaF)		99 %	Sigma
Procyanidines de pomme de type B <sub>2</sub> (DP <sub>n</sub> = 9,7)			CTCPA Avignon
Parois Cellulaires			INRA Avignon
Purée de pomme	Cold break		INRA Avignon

#### Analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Réactants	Qualité	Pureté	Fournisseur
-----------	---------	--------	-------------

# Dosage de l'activité enzymatique

## II.1 Mesure par polarographie

Le dosage de l'activité enzymatique s'effectue à 30 °C, par la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène dans le milieu réactionnel, à l'aide d'un polarographe muni d'une sonde à oxygène Bernstein de type micro-sonde de Heito (OSD23, 0-5 V) placée dans une cuve de mesure de 1,5 mL et relié à un logiciel DataStudio via un capteur de tension / intensité Pasco permettant de traiter le signal électrique de manière automatisée (**Figure 10**).

Le substrat utilisé est le 4-méthylcatéchol (4-MC), préparé dans une solution de tampon Mac Ilvaine pH 4,5 à une concentration de 20 mM pour le dosage en routine de la PPO de pomme. Pour le calcul des constantes cinétiques  $V_m$  et  $K_m$  vis-à-vis de la PPO de deux variétés de pomme (Golden Delicious et Marie-Ménard), la concentration en substrat phénolique varie entre 1 et 20 mM. La solution de substrat est saturée en air par barbotage à 30 °C, ce qui correspond à une concentration en oxygène de 0,22 mM (Wise et Naylor, 1985). Après addition de l'extrait enzymatique (10-100  $\mu$ L) à 1,4 mL de substrat dans la cuve du polarographe, l'activité enzymatique est déterminée à partir de la pente initiale de la courbe donnant la consommation d'oxygène en fonction du temps. L'activité enzymatique est exprimée en nanomoles d'oxygène consommées par seconde ou nanokatal (nkat). Dans cette méthode polarographique, la vitesse de la réaction reste proportionnelle à la quantité d'enzyme injectée jusqu'à 25 nkat d'activité PPO présente dans la cuve.

## II.2 Choix des conditions opératoires

Des conditions optimales de mesures de l'activité PPO en termes de reproductibilité et sensibilité doivent être définies au préalable. Pour cela, il est important de bien connaître la concentration initiale en oxygène disponible, de maintenir constants le pH et la température du milieu réactionnel et de bien choisir le substrat phénolique de l'enzyme.

### II.2.1 Choix du substrat phénolique

La pomme de la variété Marie-Ménard est connue pour être riche en certains composés phénoliques libres dont l'acide chlorogénique et les catéchines (Devic *et al.*, 2010) qui sont de bons substrats de la PPO.

En utilisant les extraits enzymatiques bruts issus des variétés Marie-Ménard et Golden Delicious, nous avons comparé les activités PPO en présence d'acide chlorogénique (CG), de (-)-épicatéchine (EPI) et du 4-méthylcatéchol (4-MC), préparés dans une solution de tampon Mc Ilvaine pH 4,5 et à 30 °C. Des gammes de concentration en substrat phénolique allant de 1 à 20 mM ont été utilisées pour déterminer les constantes cinétiques  $V_m$  et  $K_m$  de chacun de ces substrats dans des solutions saturées d'air à 30 °C. Les mêmes expérimentations ont été réalisées avec la PPO extraite de pomme Marie-Ménard dans une solution de tampon malate 20 mM à pH 3,8.

### **II.2.2 Influence du pH du milieu réactionnel**

Le pH des vacuoles des pommes varie selon la variété (pomme à couteau, pomme à cidre...). Pour la variété Marie-Ménard, il se situe entre pH 3,6 et pH 3,8.

La valeur du pH optimal d'activité PPO a été comparée pour deux extraits bruts enzymatiques issus des variétés Marie-Ménard et Golden Delicious en utilisant le 4-MC comme substrat phénolique. L'activité PPO a été mesurée pour des solutions de tampon Mc Ilvaine dont le pH varie de 3 à 7.

### **II.2.3 Etablissement des milieux modèles**

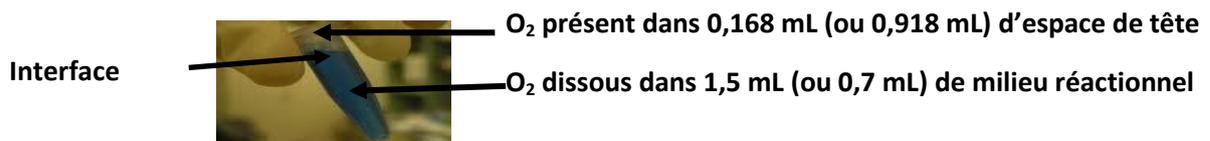
Les conditions opératoires ont été choisies pour tenter de reproduire en milieu modèle, la composition de la pomme en complexifiant au fur et à mesure les milieux modèles et étudier l'impact des différents constituants sur l'activité PPO. Par ailleurs, il était nécessaire de réaliser des mesures cinétiques d'activité PPO au cours de traitements thermiques de manière répétable.

Des tubes Eppendorf « safelock » d'un volume utile de 1,5 mL ont été employés dans toutes les expérimentations. Le milieu modèle de base est établi à l'aide d'une solution d'acide malique 20 mM ajustée à pH 3,8 avec quelques gouttes de NaOH [10 M]. Cette solution est renouvelée chaque jour d'expérimentations. Les différents composés étudiés sont directement dilués dans cette solution de tampon malate. Le contenu du tube Eppendorf se compose d'une phase gazeuse de 0,17 mL et d'une phase aqueuse comportant systématiquement 1,4 mL du milieu modèle auxquels sont ajoutés 100  $\mu$ L d'extrait enzymatique PPO.

## II.2.4 Disponibilité en oxygène dans les milieux modèles

La quantité d'oxygène disponible dans les tubes Eppendorf contenant les milieux modèles (et qui vont subir les traitements thermiques) est un paramètre important à connaître puisqu'il s'agit du substrat oxydant de la polyphénoloxydase. Cette quantité est la somme de la quantité d'O<sub>2</sub> dissous dans la phase liquide et de celle présente dans la phase gazeuse au-dessus de la phase liquide (espace de tête). Ces quantités d'oxygène peuvent être calculées si le volume et la température de chacune de ces fractions sont connus au moment de la fermeture du tube Eppendorf. Il faut ajouter la connaissance de la pression pour la phase gazeuse.

Deux ratios phase liquide / phase gazeuse ont été testés soit 1,5 mL / 0,168 mL d'une part et 0,7 mL / 0,918 mL d'autre part. La phase liquide (0,7 ou 1,5 mL) était portée à 20 ou à 50 °C. Nous avons considéré que la phase gazeuse (0,168 ou 0,918 mL) était toujours à 20 °C et à la pression atmosphérique normale (1,013 x 10<sup>5</sup> Pa).



Dans la phase gazeuse, le nombre  $n$  de moles de gaz est déterminé en utilisant la loi des gaz parfaits :  $P \cdot V = n \cdot R \cdot T$

avec  $P = 1,013 \times 10^5$  Pa  
 $V =$  volume espace de tête = 0,168 mL ou 0,918 mL  
 $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$   
 $T =$  Température = 293 K (20 °C)

Ainsi à 20 °C :

$$\rightarrow n = \frac{P \cdot V}{R \cdot T} = \frac{1,013 \cdot 10^5 \times 0,168 \cdot 10^{-6}}{8,314 \cdot 293} = 6,97 \cdot 10^{-6} \text{ moles d'air dans 0,168 mL.}$$

et

$$\rightarrow n = \frac{P \cdot V}{R \cdot T} = \frac{1,013 \cdot 10^5 \times 0,918 \cdot 10^{-6}}{8,314 \cdot 293} = 3,81 \cdot 10^{-5} \text{ moles d'air dans 0,918 mL.}$$

Sachant que l'oxygène représente 21 % de l'air, les quantités d'O<sub>2</sub> disponibles dans l'espace de tête sont respectivement de 1,46 μmol (pour 0,168 mL) et 8,01 μmol (pour 0,918 mL).

Dans la phase liquide, la quantité d'oxygène dépend de la solubilité de ce dernier dans le liquide. Dans l'eau saturée d'air, la concentration en oxygène est égale à 284  $\mu\text{M}$  à 20 °C et 172  $\mu\text{M}$  à 50 °C (**Table de WINKLER - Annexe 1**). Si l'on assimile le milieu liquide contenu dans le tube Eppendorf à de l'eau, les quantités d'oxygène dissous sont égales à :

0,43  $\mu\text{mol}$  (pour 1,5 mL) et 0,2  $\mu\text{mol}$  (pour 0,7 mL) à 20 °C et

0,26  $\mu\text{mol}$  (pour 1,5 mL) et 0,12  $\mu\text{mol}$  (pour 0,7 mL) à 50 °C.

Dès lors, dans les tubes Eppendorf traités thermiquement à 20 °C, les quantités totales d'oxygène disponible sont de 1,89 (1,46 + 0,43)  $\mu\text{mol}$  et 8,21 (8,01 + 0,2)  $\mu\text{mol}$  pour des volumes de phase liquide de 1,5 et 0,7 mL respectivement. Pour les tubes Eppendorf traités thermiquement à 50 °C, les quantités totales d'oxygène disponible sont de 1,72 (1,46 + 0,26)  $\mu\text{mol}$  et 8,13 (8,01 + 0,12)  $\mu\text{mol}$  pour des volumes de phase liquide de 1,5 et 0,7 mL respectivement.

## **II.3 Traitements thermiques**

### **II.3.1 Matériel**

Le chauffage des milieux modèles (1,5 mL) au-dessus de la température ambiante s'effectue à l'aide de deux blocs chauffants à sec analogiques (VWR). Ces blocs chauffants munis d'une minuterie ont chacun une capacité de 20 tubes Eppendorf de 1,5 mL avec une plage de température de l'ambiante à + 120 °C. Ce matériel permet d'atteindre la température d'étude désirée (30 – 90 °C) au sein de l'échantillon en 10 min, de manière uniforme sur l'ensemble des blocs et avec une incertitude de l'ordre de  $\pm 0,1$  °C. Aux températures d'étude de 70 et 90 °C, on note toutefois un phénomène de condensation au niveau de l'espace de tête du tube.

### **II.3.2 Composition des milieux modèles**

La nature et la concentration des différents constituants rentrant dans la composition de la pomme sont issues des travaux de Le Bourvellec *et al.* (2007) et de Devic *et al.* (2010).

En partant d'une solution de base de tampon malate 20 mM à pH 3,8 les différents milieux modèles dans lesquels sera introduite la PPO sont donc les suivants :

\* une solution glucidique contenant 58,5  $\text{g.L}^{-1}$  de fructose, 28,5  $\text{g.L}^{-1}$  de glucose et 25,1  $\text{g.L}^{-1}$  de saccharose,

- \* une solution ionique contenant du CaCl<sub>2</sub> (1,2 mM), du KCl (6,7 mM) et du MgCl<sub>2</sub> (2 mM),
- \* une solution d'acide chlorogénique (CG) (0,56 mM),
- \* une solution de (-)-épicatéchine (EPI) (0,34 mM),
- \* un mélange de CG (0,56 mM) et d'EPI (0,34 mM),
- \* une solution de procyanidines de type B<sub>2</sub> de degré de polymérisation moyen (DPn = 9,7) 0,5 g.L<sup>-1</sup>,
- \* une solution d'acide ascorbique (AA) de concentration variable (1 à 5,6 mM),
- \* une solution d'acide déhydroascorbique (DHA) (2,8 ou 5,6 mM),
- \* un mélange d'AA (2,8 mM) et de DHA (2,8 mM),
- \* un mélange d'AA (5,6 mM), de CG (0,56 mM) et d'EPI (0,34 mM),
- \* une solution de 3 hydroxy-2-pyrone (3H2P) (33,3 ou 100 μM),
- \* une solution d'acide furoïque (AF) (33,3 ou 100 μM),
- \* une suspension de parois cellulaires de 0,5 à 5 g.L<sup>-1</sup>,
- \* une suspension de purée de pomme préparée selon un procédé Cold Break et diluée au demi dans une solution de tampon malate (20 mM à pH 3,8).

Les procyanidines de type B<sub>2</sub> nous ont été fournies par le CTCPA d'Avignon. Elles ont été obtenues selon la méthode décrite par Guyot *et al.* (2001). Les parois cellulaires nous ont été fournies par l'INRA d'Avignon. Elles ont été obtenues selon le protocole décrit par Renard *et al.* (2001).

### **II.3.4 Protocole de traitement thermique**

1400 μL de solution ou de suspensions de chacun des milieux modèles étudiés sont introduits dans un tube Eppendorf et subissent une étape de préchauffage à la température d'étude pendant 10 min. Après le préchauffage, 100μL de PPO sont ajoutés et homogénéisés avant le début de la cinétique thermique. Pour chaque température étudiée, le chauffage du milieu réactionnel contenant la PPO est prolongé pendant 2 h avec un prélèvement toutes les 15 minutes. Les prélèvements sont rapidement refroidis dans un bain à 0 °C pendant 2 minutes. Sur chacun des prélèvements sont mesurées l'activité PPO résiduelle par polarographie et les teneurs résiduelles en composés phénoliques et en acide ascorbique par HPLC-DAD (**Figure 11**). Pour les dosages effectués par CLHP, les prélèvements sont additionnés d'un milieu d'arrêt contenant le NaF selon le protocole mis au point par Janovitz-Klapp (1989). Chaque manipulation est répétée 3 fois. Pour certains milieux modèles (parois cellulaires et purée diluée), une centrifugation de 2 min à 8000 g précède le prélèvement.

Dans un premier temps, l'étude de la thermodénaturation de la polyphénoloxydase seule à pH 3,8 a été effectuée dans une gamme de température allant de 30 à 80 °C. Par la suite, l'évolution de l'activité de la PPO incorporée dans les différents milieux modèles sera étudiée à deux températures : 20 et 50 °C.

## **Méthode de dosage des composés phénoliques (CG, EPI) par CLHP-UV**

Les concentrations en acide chlorogénique et en (-)-épicatéchine dans les milieux modèles EPI/PPO, CG/PPO, EPI/CG/PPO et EPI/CG/AA/PPO ont été déterminées par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) avec une détection à barrette de diodes. A l'issue du traitement thermique, les milieux réactionnels sont refroidis et dilués au ½ dans une solution d'arrêt contenant la phase mobile (eau acidifié pH 2,6 / acétonitrile) ainsi que du NaF à 5 mM, concentration nécessaire à l'inhibition complète de la PPO Marie-Ménard puis filtrés sur nylon 0,2 µm (filtres AIT Chromato).

Le système chromatographique est un CLHP DIONEX Ultimate 3000 équipé d'une pompe DIONEX LPG-3400A, d'un injecteur automatique, d'un compartiment à colonne thermostaté ACC-300T et d'un détecteur à barrette de diodes DIONEX 3000. 20 µL d'échantillon y sont injectés. Le détecteur à barrette de diodes relié au système CLHP permet d'obtenir des spectres entre 190 et 800 nm (résolution spectrale de 1 nm). Les longueurs d'onde correspondant à une absorbance maximale de CG et EPI sont respectivement égales à 326 et 280 nm. Le logiciel de traitement du signal est la Version 6.8 de Chroméléon.

Les conditions chromatographiques utilisées sont les suivantes :

- \* Phase stationnaire : colonne ODS AQ (25 / 0,46 cm) AIT YMC, 5 µm munie d'une précolonne de même remplissage (8 / 4 mm),
- \* Phase mobile : élution effectuée en mode isocratique, eau (acide acétique glacial 0,2 %) / acétonitrile (82 / 18). Le pH est fixé à 2,6 et le débit d'élution à 1 mL.min<sup>-1</sup>,
- \* Injection : la boucle d'injection est de 20 µL,
- \* Température de la colonne : 30 °C
- \* Pression : 130 bars
- \* Durée d'analyse : inférieure à 20 min.
- \* Détection : CG, λ = 326 nm et EPI, λ = 280 nm.

# Méthode de dosage de l'acide ascorbique par CLHP-UV

Les concentrations en acide ascorbique dans les milieux modèles AA, AA/PPO, AA/CG/EPI/PPO ont été déterminées par CLHP avec une détection à barrette de diodes. A l'issue du traitement thermique, les milieux réactionnels sont refroidis et dilués au 20e dans une solution de tampon phosphate d'ammonium 20 mM à pH 2,5. 20 µL d'échantillon sont injectés à l'aide d'une vanne d'injection Rhéodyne dans un système CLHP VARIAN équipé d'une pompe de modèle 9012 et d'un détecteur UV-VIS de modèle 9050. Le logiciel utilisé est la version 4.51 de STAR. La phase mobile est composée d'une solution de phosphate d'ammonium à 20 mM à pH 2,5. La phase stationnaire est constituée d'une colonne C18 YMC ODS AQ 5 µm (AIT France). L'élution est effectuée en mode isocratique avec 100 % de phase aqueuse. Le détecteur à barrette de diodes relié au système CLHP permet d'obtenir des spectres entre 190 et 800 nm (résolution spectrale de 1,2 nm). La longueur d'onde choisie pour le dosage est égale à 244 nm.

Un exemple de spectre d'AA en solution dans du tampon malate 20 mM à pH 3,8 obtenu par CLHP-UV est présenté **figure 12**.

Les conditions chromatographiques utilisées sont les suivantes :

- \* Phase stationnaire : colonne ODS AQ (25 / 0,46 cm) AIT YMC, 5 µm munie d'une précolonne de même remplissage (8 / 4 mm),
- \* Phase mobile : élution effectuée en mode isocratique, tampon phosphate d'ammonium 20 mM. Le pH est fixé à 2,5 et le débit d'élution à 1 mL.min<sup>-1</sup>,
- \* Injection : la boucle d'injection est de 20 µL
- \* Température de la colonne : celle de la pièce
- \* Pression : 1400 - 1600 psi, soit l'équivalent de 90 - 100 bars
- \* Durée d'analyse : 6 min
- \* Détection AA :  $\lambda = 244 \text{ nm}$

# Méthode de dosage des produits de dégradation de l'acide ascorbique par CLHP-UV

La dégradation de l'acide ascorbique au cours des traitements thermiques conduit à la formation de différents composés de dégradation oxydative et ou thermique. L'acide déhydroascorbique (DHA) le premier de ses produits d'oxydation, se dégrade par la suite en divers composés pour donner principalement 2 produits finaux d'oxydation, le 3-hydroxy-2-pyrone (3H2P) et l'acide furoïque (AF).

Outre ces 2 derniers, le furfural et le 5-HMF, produits de dégradation thermique de l'acide ascorbique, sont suivis par HPLC DAD aux  $\lambda_{\text{max}}$  décrites **tableau IV**. L'AA résiduel est quantifié séparément à partir des mêmes échantillons par CLHP.

Après chaque traitement thermique, les échantillons sont refroidis, filtrés à l'aide de filtres nylon (25 mm 0,22  $\mu\text{M}$ ) et 20  $\mu\text{L}$  sont directement injectés.

Le système chromatographique est identique à celui utilisé pour l'analyse des composés phénoliques (CG et EPI) :

\* La phase mobile est constituée d'un mélange d'une solution A (eau acidifiée à pH 2,6 par de l'acide acétique) et d'une solution B (acétonitrile).

\* La phase stationnaire est constituée par une colonne Synergi 4  $\mu\text{m}$  Polar-RP 80A (Phenomenex), couplée à une précolonne Security Guard de même marque. La colonne est thermostatée à 30 °C et les échantillons sont conservés à  $10 \pm 2$  °C. Le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$  pour un débit fixé à 1 mL.min<sup>-1</sup>.

En milieu simple ne comportant pas de composés phénoliques, l'élution est effectuée en mode isocratique avec 96 % de solution A et 4 % de la solution B pendant 7 min.

En milieu complexe (avec phénols), l'élution est réalisée en gradient, avec 4 % de solution B et 96 % de solution A pendant 5 min, puis 20 % de solution B et 80 % de solution A pendant 5 min, pour terminer à 4 % de solution B et 96 % de solution A en 5 min.

Les caractéristiques chromatographiques du 3H2P, de l'AF, du furfural et du 5HMF figurent dans le tableau IV. Un exemple de chromatogramme obtenu en CLHP-DAD montrant la séparation entre AA, ses produits de dégradation et les composés phénoliques est présenté **figure 13**.





## **Chapitre 3 : RÉSULTATS**

L'objectif premier de ce travail est de mieux cerner les facteurs susceptibles d'influencer la thermosensibilité de la PPO de pomme lors de traitements technologiques appliqués aux produits transformés de ce fruit, en particulier les compotes. Pour cela, dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions de dosage de l'activité PPO dans les extraits enzymatiques que nous avons utilisés pour allier sensibilité et reproductibilité. Dans un second temps, nous avons appliqué ces conditions au suivi de l'évolution de l'activité PPO résiduelle lors de traitements thermiques isothermes appliqués à des milieux modèles simples au départ, puis progressivement compliqués pour se rapprocher du milieu « naturel » constitué par un broyat de pommes. Ainsi ont été étudiés successivement les impacts éventuels de l'ajout de sucres, de sels, de phénols naturellement présents dans la pomme (acide chlorogénique, (-)-épicatéchine, procyanidines), d'acide ascorbique, de produits de dégradation de ce dernier, de parois cellulaires et de purée de pommes. Parallèlement au suivi de l'activité PPO résiduelle, ont été également analysés dans plusieurs cas, les devenir des phénols (acide chlorogénique et (-)-épicatéchine) et de l'acide ascorbique pendant ces traitements.

## **Etudes préliminaires : choix des conditions opératoires**

Les mesures d'activités enzymatiques dépendent de la nature de l'extrait enzymatique ainsi que des conditions dans lesquelles elles s'opèrent. Dans le cadre de notre étude, il était important de connaître et de maîtriser les paramètres environnementaux et les conditions opératoires (pH du milieu réactionnel, température d'étude) afin de pouvoir étudier l'impact de chacun des composés ajoutés aux milieux modèles sur l'activité PPO de pomme.

### **I.1 Choix des extraits enzymatiques, des conditions de dosage et des conditions de suivi de l'activité résiduelle dans les milieux modèles**

La comparaison de l'activité de l'extrait brut de PPO issu du lot de pomme Marie-Ménard (vergers de Rennes) à celle d'extraits de pommes commerciales de la variété Golden Delicious, nous a permis d'établir une première comparaison des activités PPO. Les deux extraits enzymatiques obtenus selon le même procédé montrent des différences notables.

En effet, la variété Marie-Ménard présente une activité PPO environ sept fois plus importante que celle de la variété Golden Delicious à pH 4,5 (**Tableau V**).

Pour ces 2 extraits bruts enzymatiques, la comparaison des activités vis-à-vis de 3 substrats a permis de déterminer leurs constantes cinétique ( $V_m$ ,  $K_m$ ) et leur efficacité de catalyse vis-à-vis de 3 substrats phénoliques (4-MC, EPI et CG) à pH 4,5 pour les deux variétés et à pH 3,8 pour la variété Marie-Ménard (**Tableau VI**).

A pH 4,5 pour les deux variétés, l'activité maximale est obtenue avec le 4-MC alors que la meilleure efficacité ( $V_m / K_m$ ) est observée avec l'acide chlorogénique en raison d'une meilleure affinité de la PPO pour ce dernier par rapport au 4-MC. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Janovitz-Klapp (1989) avec la PPO isolée de la variété Red Delicious. A pH 3,8 dans le tampon malate, l'affinité de la PPO de la variété Marie-Ménard est pratiquement inchangée pour les 3 phénols étudiés, alors que l'activité maximale ne représente plus que 60 % de celle mesurée à pH 4,5 avec les mêmes substrats, là encore les résultats sont en accord avec ceux de Janovitz-Klapp (1989).

Même si l'EPI et le CG sont des composés phénoliques endogènes de la pomme, notre choix s'est porté sur le 4-MC car il est facile à mettre en œuvre, couramment utilisé en laboratoire et permet d'obtenir les activités les plus fortes à saturation en substrat.

La pomme Golden Delicious est la variété la plus utilisée dans la production de purée et de desserts fruitiers alors que la variété Marie-Ménard est plus généralement transformée dans la filière jus de pomme et jus de cidre, compte tenu de sa richesse en polyphénols. Cette dernière variété apparaît la mieux adaptée pour l'étude de la thermosensibilité en raison de son activité enzymatique importante qui permet une meilleure sensibilité de la mesure de l'activité PPO résiduelle lors de nos expérimentations de dénaturation thermique.

Dans plusieurs expérimentations, nous souhaitons mesurer simultanément l'activité PPO résiduelle et les teneurs en composés phénoliques (CG et EPI) et en acide ascorbique. Pour cela, il nous a paru plus judicieux de dédier le contenu total d'un tube Eppendorf à ces analyses, en d'autres termes de préparer un tube Eppendorf par durée et température de traitement. Pour cela, il nous fallait notamment maîtriser la reproductibilité de la disponibilité en oxygène dans le milieu étudié.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'évolution des activités PPO résiduelles lors d'un chauffage à 60 °C pendant 2 h lorsque le tube Eppendorf était fermé ou bien ouvert et contenait 1,5 mL de milieu réactionnel (**Figure 14**).

L'activité résiduelle de la PPO dans les tubes « restés ouverts » est systématiquement supérieure (avec une moins bonne reproductibilité) à celle des tubes fermés pendant le traitement thermique et ceci quel que soit le temps de chauffage. L'écart relatif augmente avec la durée de chauffage puisque l'activité résiduelle est près de 2 fois plus élevée dans le tube ouvert après 30 min de chauffage par rapport au tube fermé alors qu'elle est 4 à 5 fois plus élevée après 105 min de chauffage à 60 °C. Il est probable que dans le cas des tubes ouverts, une concentration progressive du milieu liquide, due à l'évaporation de la phase aqueuse ait lieu au cours du chauffage. Cette concentration dans les tubes ouverts se traduirait par une augmentation apparente de l'activité résiduelle par rapport aux tubes fermés.

Dès lors, les expérimentations ont systématiquement été réalisées dans des tubes Eppendorf fermés dans lesquels les volumes de phase liquide et de phase gazeuse restaient constants pendant toute la durée du traitement thermique. Avec ce protocole, il n'y a donc pas d'apport d'oxygène provenant de l'air extérieur, seuls des phénomènes de diffusions entre l'O<sub>2</sub> de la phase gazeuse emprisonnée à la fermeture du tube Eppendorf et l'O<sub>2</sub> dissous dans la phase aqueuse peuvent se produire.

Dans un second temps, nous avons comparé la cinétique de dénaturation des activités PPO mesurées dans des tubes Eppendorf moyennement remplis (0,75 mL de liquide) et remplis avec un maximum de liquide (1,5 mL) (**Figure 15**). Aucune différence n'est observée pendant les 30 premières minutes de chauffage à 60 °C, au-delà l'activité PPO résiduelle est plus élevée (avec une meilleure reproductibilité) dans les tubes Eppendorf remplis avec 1,5 mL de liquide. Compte tenu de la meilleure reproductibilité et des besoins analytiques en volume d'échantillon lorsque les teneurs en CG, EPI et AA doivent être déterminées simultanément, nous avons décidé de conduire nos expérimentations avec des tubes Eppendorf remplis avec 1,5 mL de liquide et fermés.

Dans ces conditions, lorsque l'ensemble est à 20 °C, la quantité d'oxygène disponible dans les tubes Eppendorf au moment de la fermeture est de 0,43 μmol dissous dans la phase liquide et de 1,5 μmol dans la phase gazeuse (**Tableau VII**). Si l'on admet une stœchiométrie de ½ mole d'oxygène pour oxyder une mole de CG (ou d'EPI), il apparaît que l'oxygène dissous est théoriquement suffisant pour oxyder la totalité de CG (ou d'EPI) lorsqu'ils sont seuls présents. Lorsque les deux phénols sont simultanément présents, l'apport de l'oxygène gazeux est nécessaire pour oxyder l'ensemble des 2 phénols. Lors de l'ajout d'acide ascorbique, l'oxygène devient très rapidement limitant pour oxyder l'ensemble des composés réducteurs.

## I.2 Evolution l'activité PPO de pomme en fonction de la température du traitement thermique

Les polyphénoloxydase végétales en général et celle en particulier de la pomme sont connues pour être des enzymes thermosensibles (Vamos-Vigyazo, 1981). Cependant, les caractéristiques de thermosensibilité peuvent varier d'un cultivar de pomme à l'autre. Pour cette raison, nous avons dans un premier temps étudié l'évolution de l'activité de l'extrait brut de la PPO Marie-Ménard pour différents couples temps-température de traitement allant de 30 à 80 °C. Ceci nous a permis de déterminer l'énergie d'activation de la dénaturation thermique  $E_a$  de cet extrait dans cette gamme de température.

La **figure 16** montre l'évolution de l'activité enzymatique PPO en fonction de la température de chauffage (entre 30 et 70 °C) pendant des durées allant jusqu'à 180 min pour les températures les plus basses. La gamme de température choisie englobe aussi bien les traitements thermiques de type très modéré tels que la thermisation (45 à 62 °C) que ceux plus importants tels que la pasteurisation basse (60 à 72 °C) dont le but est de détruire la plupart des micro-organismes et en particulier, les bactéries pathogènes non sporulées.

A 30 °C, la perte d'activité PPO évolue très lentement puisqu'elle inférieure à 30 % après 3 h à cette température. Logiquement, la vitesse de dénaturation s'accroît lorsque la température augmente. Ainsi, la perte d'activité est quasi-totale après 90 min à 60 °C et après 10 min à 70 °C. Nous avons constaté par ailleurs qu'à 80 °C, l'activité PPO de l'extrait brut de pomme Marie-Ménard est entièrement dénaturée en moins de 3 min (résultats non montrés). Cela confirme les résultats obtenus par de nombreux auteurs, montrant l'inactivation thermique avec la PPO issue de différentes variétés de pomme, (Yemenicioglu *et al.*, 1997) ainsi que sur le jus de pomme (Buckow *et al.*, 2009).

Pour la suite du travail au cours duquel nous souhaitons étudier l'impact de divers composants de la purée de pomme sur la thermosensibilité de la PPO, nous avons choisi de réaliser le traitement thermique à 50 °C. A cette température, la vitesse de dénaturation est moyenne de telle sorte que l'activité résiduelle est supérieure à 25 % après 2 h de traitement. Ce choix devrait permettre d'analyser avec précision la thermosensibilité de l'enzyme mais aussi de mesurer les effets de l'activité PPO résiduelle sur le devenir des substrats phénoliques et de l'acide ascorbique sur une durée suffisante (2 h) pour obtenir plusieurs points de cinétique avec une reproductibilité suffisante.

### I.3 Calcul des vitesses de dénaturation et détermination de l'énergie d'activation de dénaturation de la PPO de pomme

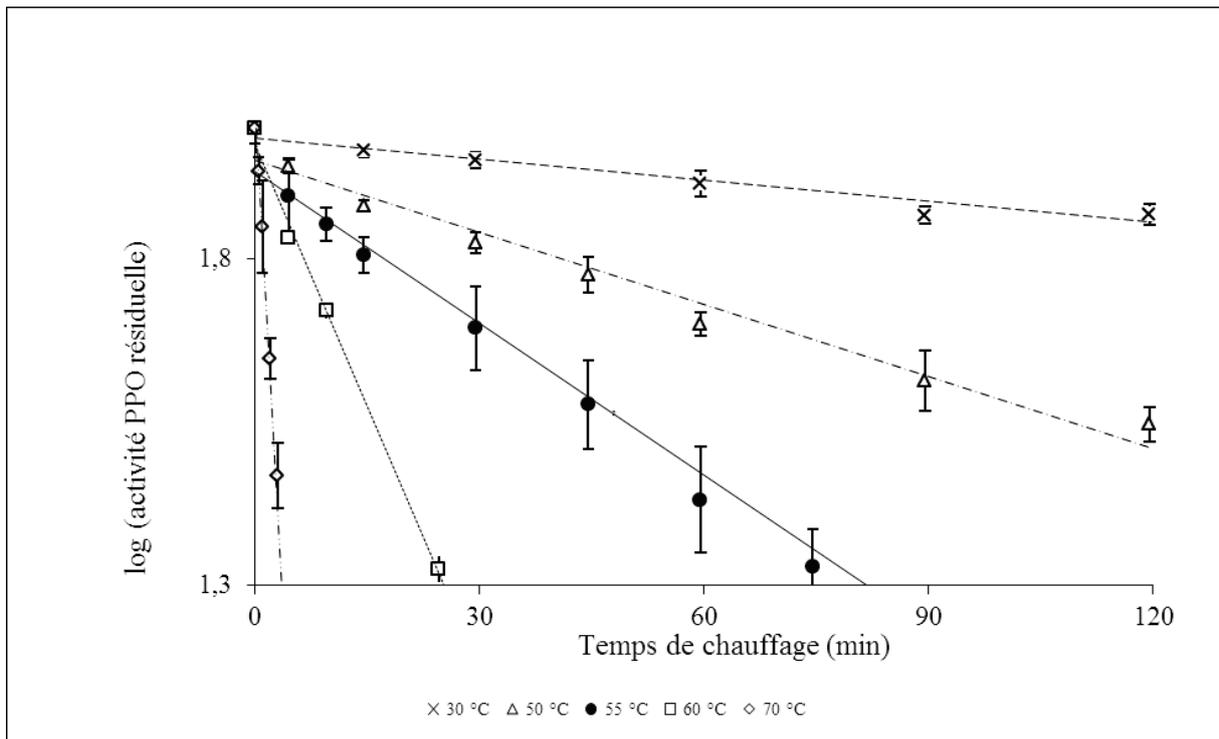
Une réaction d'inactivation de la PPO de premier ordre a déjà été montrée par plusieurs auteurs sur le raisin et l'avocat (Weemaes *et al.*, 1998) et sur la pomme (Soysal, 2008).

Dans le cas d'une réaction de premier ordre, il est courant de porter le logarithme de l'activité résiduelle en fonction du temps. Une droite est obtenue dont la pente est représentative de la constante de vitesse de la réaction (exprimée en  $\text{min}^{-1}$  si le temps est exprimé en min).

Un examen attentif des cinétique de dénaturation, présentée **figure 16**, montre que dès le premier point de mesure (réalisée après 30 sec de traitement), une perte de 10 à 15 % de l'activité PPO est observée indépendamment de la température entre 50 et 70 °C. Cette chute initiale très rapide est suivie d'une diminution de l'activité résiduelle dont la vitesse dépend de la température. Il est probable que l'extrait brut contienne une forme (minoritaire) de PPO particulièrement thermosensible.

Il est possible également que l'extrait brut de Marie-Ménard contienne des phénols oxydés qui dénaturent très rapidement un faible pourcentage de la PPO présente dès le début du chauffage. Afin de déterminer les vitesses de dénaturation lors de ces expérimentations, nous avons choisi de n'utiliser que les points expérimentaux obtenus après 30 secondes de traitement et en prenant comme activité initiale, la valeur mesurée lors du premier prélèvement (après 30 s de traitement).

La **figure 17** donne l'évolution du logarithme népérien de l'activité résiduelle (exprimée en pourcentage de l'activité initiale) en fonction du temps de traitement pour des températures allant de 30 à 70 °C. Quelle que soit la température, cette représentation aboutit à une droite dont la pente est égale à la constante de vitesse de dénaturation de la PPO.



**Fig.17 : Logarithme de l'activité PPO résiduelle en fonction du temps de chauffage (0-180 min) à différentes températures (30 - 70 °C)**

Les résultats donnant les valeurs des constantes de vitesse  $k$  en fonction de la température sont regroupés dans le **tableau VIII**. A partir de ces valeurs de  $k$ , il est possible de calculer le paramètre  $D$  (temps nécessaire pour diviser par 10 l'activité résiduelle à température constante), paramètre fréquemment utilisé en technologie, puisque :

$$D = 2,3 / k \quad (1)$$

avec  $k$  = Constante de vitesse (en  $\text{min}^{-1}$ )

$D$  = Temps nécessaire pour diviser par dix l'activité enzymatique à température constante (en min)

Les valeurs de  $D$  ainsi calculées, sont également indiquées dans le **tableau X**.

Si l'on admet que l'évolution des constantes de vitesse de la réaction d'inactivation de la PPO en fonction de la température suit la loi d'Arrhenius :

$$d [ \text{Ln} (k) ] / dT = E_a / (RT^2) \quad (2)$$

avec  $k$  = Constante de vitesse (en  $\text{min}^{-1}$ )

$T$  = Température (Kelvin)

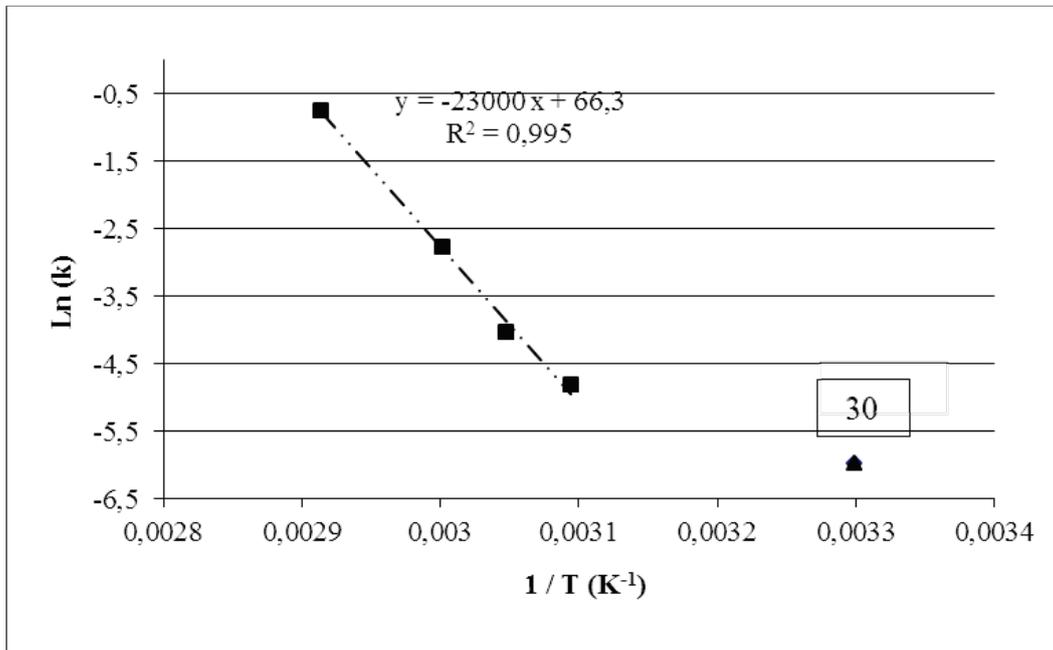
$E_a$  = Energie d'activation ( $\text{J.mole}^{-1}$ )

$R$  = Constante des gaz parfaits ( $8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ )

Il est possible, en supposant que l'énergie d'activation de la réaction d'inactivation est constante dans la plage de température étudiée, d'intégrer l'équation (2) pour obtenir la relation liant les constantes de vitesses à deux températures différentes ( $T_1$  et  $T_2$ ) :

$$\text{Ln} (k_1 / k_2) = (- E_a / R) * (1 / T_1 - 1 / T_2) \quad (3)$$

Pour déterminer la valeur de l'énergie d'activation, le logarithme népérien de la constante de vitesse est porté en fonction de l'inverse de la température exprimée en Kelvin (**Figure 18**). Une droite est obtenue dont la pente est proportionnelle à l'énergie d'activation (elle est égale à  $E_a / R$ ).



**Fig.18 :  $\ln k$  en fonction de  $1/T$  aux différentes températures de chauffage (30-70 °C)**

Un excellent alignement des points représentatifs des constantes de vitesses déterminées entre 50 et 70 °C est observé. Cependant, le point à 30 °C s'écarte notablement de la droite. Il est probable qu'à cette température, le phénomène d'inactivation mesuré ne soit pas seulement dû à un effet thermique mais qu'il soit aussi lié à d'autres paramètres peu sensibles à l'augmentation de température. Il pourrait également s'agir de la thermodénaturation de la forme (minoritaire) très thermosensible évoquée précédemment.

Outre l'énergie d'activation, l'effet de la température sur les constantes de vitesse de réaction peut également être exprimé par la valeur de  $z$  (augmentation de température provoquant une division par 10 de la valeur du  $D$ ) ou par la valeur du  $Q_{10}$  (rapport des constantes de vitesse de réaction lorsque la température augmente de 10 °C). Les relations permettant le calcul de ces paramètres sont les suivantes :

$$\log (D_1 / D_2) = (\theta_2 - \theta_1) / z \quad (4)$$

avec  $D_1$  et  $D_2$  = valeurs du  $D$  aux températures  $\theta_1$  et  $\theta_2$  respectivement

$z$  = augmentation de température permettant une division par 10 de la valeur du  $D$

$$Q_{10} = k_{\theta+10} / k_{\theta} \quad (5)$$

avec  $Q_{10}$  = rapport des constantes de vitesse lorsque la température augmente de 10 °C

$k_{\theta+10}$  et  $k_{\theta}$  = constantes de vitesse de la réaction aux températures  $\theta+10$  et  $\theta$  respectivement.

Les valeurs d'énergie d'activation, de  $z$  et de  $Q_{10}$  ainsi calculées entre 50 et 70 °C sont également données dans le **tableau VIII**.

L'énergie d'activation de la dénaturation thermique de la PPO de pomme Marie-Ménard est proche de 190 kJ. mol<sup>-1</sup> dans la gamme de température de 50 à 70 °C. Cette énergie d'inactivation thermique de la PPO varie selon les diverses variétés de pomme. D'autres études sur un extrait brut de pomme Golden Delicious rapportent des valeurs d'énergies d'activation de la thermodénaturation de la PPO de 111 kJ.mol<sup>-1</sup> pour  $T \leq 72,5$  °C (Weemaes *et al.*, 1998) et 230 kJ.mol<sup>-1</sup> pour  $65$  °C  $\leq T \leq 78$  °C (Yemenicioglu *et al.*, 1997).

## **Comparaisons de la stabilité de l'extrait brut de PPO à 20 et à 50 °C dans différents milieux**

Dans ce chapitre, nous allons successivement examiner les effets de l'ajout de sels, de sucres, de phénols (acide chlorogénique, (-)-épicatéchine, procyanidines) naturellement présents dans la pomme, d'acide ascorbique et de certains de ses produits de dégradation, de parois cellulaires et de purée de pommes sur la stabilité de l'activité PPO à 20 et 50 °C.

### **II.1 Effet de l'ajout de sels et de sucres**

Afin de se rapprocher au plus près de la composition chimique de la purée de pomme industrielle, plusieurs milieux modèles simples ont été étudiés afin de connaître leurs interactions éventuelles avec la PPO au cours du traitement thermique. Ces milieux modèles simples sont constitués des glucides et des sels présents dans les mêmes concentrations que dans la purée industrielle (**Tableau III**).

La composition de la solution ionique que nous avons utilisée en tampon malate à pH 3,8 est basée sur la composition moyenne des pommes de type Golden Delicious, 1,2 mM en CaCl<sub>2</sub> + 2 mM en MgCl<sub>2</sub> + 6,7 mM en KCl. De même, celle de la solution glucidique est basée sur la composition

moyenne des pommes de type Golden Delicious, 0,32 mM en fructose + 0,16 mM en glucose + 0,07 mM en saccharose.

Les résultats de la mesure d'activité PPO à 20 et à 50 °C dans la solution ionique sont présentés **figure 19** et ceux dans la solution glucidique **figure 20**. Aux deux températures étudiées, la stabilité de l'activité PPO est peu modifiée par la présence de sels ou de glucides, tout au long de la durée de contact de 2 heures. Seule, un ralentissement de la dénaturation est observé dans la solution glucidique à 50 °C et uniquement pendant la première heure de traitement.

En ce qui concerne la solution glucidique, la durée du traitement à 50 °C est insuffisante pour générer des produits de dégradation des glucides qui eux pourraient éventuellement présenter un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité PPO. Les concentrations très faibles en glucides ne permettent pas non plus d'observer un phénomène de déshydratation osmotique qui pourrait également limiter de l'activité enzymatique par une forte diminution de l'activité de l'eau ( $A_w$ ), comme l'ont montré certains auteurs avec la pomme Granny-Smith (Quilès *et al.*, 2005).

## **II.2 Effet de l'ajout CG et / ou d'EPI**

Le choix de CG et d'EPI et de leurs concentrations (0,56 et 0,34 mM respectivement) s'explique aisément puisqu'il s'agit des deux  $\alpha$ -diphénols (monomères) majoritaires de la pomme et qu'ils constituent d'excellents substrats de la PPO (Nicolas *et al.*, 1994). Il est donc justifié d'étudier l'impact de leur présence sur la thermostabilité de la PPO mais également l'effet du traitement thermique sur leur dégradation par voie enzymatique (et / ou non enzymatique). Une meilleure connaissance de ces phénomènes devrait permettre de mieux appréhender l'impact du traitement thermique sur la composition et la couleur du produit final.

### ***II.2.1 Stabilité de la PPO***

L'évolution de l'activité PPO contenue dans du tampon malate 20 mM à pH 3,8 en présence de CG à 0,56 mM, d'EPI à 0,34 mM ainsi que du mélange CG + EPI a été suivie pendant 2 h à 20 et 50 °C.

L'évolution de l'activité PPO à 20 °C est représentée **figure 21**. Par rapport à la courbe obtenue en absence de phénol ajouté, aucune différence significative n'est observée en présence de CG seul ou en mélange avec EPI, la baisse maximale de l'activité résiduelle reste inférieure à 20 % après 120 min de contact. L'ajout d'EPI seul provoque une perte significativement plus importante dès les premières 30 minutes de contact pour atteindre près de 35 % de pertes après 120 min. Il est possible que les *o*-quinones d'EPI produites enzymatiquement beaucoup plus instables donc plus réactives que celles de CG (Forget-Richard, 1990) soient plus agressives vis-à-vis de la PPO. Lorsque les deux phénols sont mélange, l'activité PPO pourrait être plus stable du fait de la présence continue de CG pendant les 2 h de contact (voir paragraphe suivant).

L'évolution de l'activité PPO à 50 °C est représentée **figure 22**. Par rapport à la courbe obtenue en absence de phénol ajouté, la chute initiale de l'activité observée au cours des 15 premières minutes n'est plus observée lors de l'ajout de CG et / ou d'EPI. Il est possible que la forme (minoritaire) de PPO très thermosensible le soit moins en présence d'un substrat *o*-diphénolique.

Au-delà de 30 minutes, on observe toujours une dénaturation de la PPO plus accentuée en présence d'EPI seule qu'en présence de CG seul ou en mélange avec EPI. Les mêmes explications que précédemment peuvent être évoquées, *o*-quinones d'EPI plus agressives que celles de CG et / ou effet protecteur de la présence continue de CG, pour expliquer ce résultat.

### ***II.2.2 Consommation de CG et d'EPI à 20 et 50 °C***

En parallèle de l'évolution de l'activité PPO dans le milieu malate à pH 3,8, nous avons suivi l'évolution des teneurs en CG et en EPI, seuls ou en mélange, pendant 2 h à 20 et 50 °C (**Figures 23b et 24b**).

En absence de PPO, aucune dégradation significative n'est observée à 20 et 50 °C pendant les deux heures de suivi tant pour CG que pour EPI (**Figures 23a et 24a**). Ainsi sur la durée de notre étude, les phénomènes d'oxydation non enzymatique de ces deux phénols apparaissent négligeables.

A 20 °C, lorsque les résultats sont exprimés en % de phénols résiduels, les pertes en CG et en EPI ont une allure très proche lorsqu'ils sont présents seuls. Cependant, étant donné que la concentration initiale en CG (0,56 mM) est supérieure à celle en EPI (0,34 mM), il en résulte que pour un temps équivalent, les pertes quantitatives en CG sont toujours plus importantes que celles en EPI. CG est le substrat préférentiel de la PPO de pomme en accord avec la littérature (Heimdal *et al.*, 1994 ; Nicolas *et al.*, 1994).

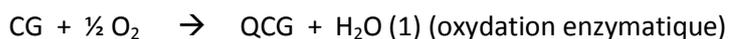
Lorsque les deux phénols sont présents simultanément, les pertes en EPI sont fortement accrues puisque l'EPI est totalement consommé en 15 minutes alors que celles en CG ne sont pas affectées ou légèrement diminuées notamment après 60 minutes. Des résultats similaires ont été proposés par Forget-Richard (1992) pour l'oxydation du mélange CG et EPI en présence de PPO de pomme et Cheynier *et al.* (1989) pour l'oxydation du mélange acide caftarique (équivalent de CG) et EPI en présence de PPO de raisin.

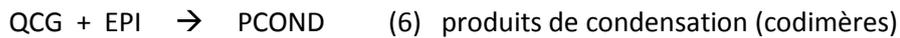
A 50 °C, les résultats sont qualitativement identiques à ceux observés à 20 °C, oxydation plus rapide pour CG que pour EPI lorsqu'ils sont présents seuls et lorsqu'ils sont en mélange forte accélération de l'oxydation d'EPI et ralentissement de celle de CG. Cependant quantitativement, les écarts sont beaucoup plus importants.

Ainsi après 15 min à 50 °C, plus de 60 % de CG est oxydé lorsqu'il est seul présent comparé à 20 % pour l'EPI lorsqu'il est seul. Lorsqu'ils sont en mélange, la dégradation de CG n'est plus que de 40 % alors qu'elle est totale pour l'EPI.

Lorsque chacun des phénols est présent seul, les résultats observés sont conformes aux données cinétiques établis précédemment (**Tableau VI**). En effet à pH 3,8 pour CG, le  $V_m$  est supérieur de plus de 30 % à celui obtenu pour EPI alors que le  $K_m$  est inférieur de plus de 30 % ce qui conduit à une efficacité de la PPO de Marie-Ménard double pour CG par rapport à EPI. De plus, la concentration initiale en CG est de 60 % supérieure à celle en EPI. Il est donc logique que dans nos conditions et avec la même quantité d'enzyme, la consommation de CG soit plus rapide que celle d'EPI.

Les résultats observés lorsque les deux phénols sont présents simultanément s'expliquent par les réactions secondaires (non enzymatiques) affectant les *o*-quinones formées enzymatiquement (**Figure 25**). En effet, outre les réactions enzymatiques de formation des *o*-quinones (réactions 1 et 2), différentes réactions non enzymatiques mettant en jeu les *o*-quinones ont été proposées par Nicolas *et al.* (1994).





avec QCG : o-quinones issues de CG

QEPI : o-quinones issues d'EPI

DIEPI : dimères d'EPI

DICG : dimères de CG

PCOND : codimères de CG et EPI

**Figure 25 : Réactions enzymatiques et non enzymatiques  
impliquant CG et EPI et leurs o-quinones**

Ces réactions concernent notamment celle de l'o-quinone de CG (QCG) avec EPI (réaction 3 de la **figure 25**) qui accroît les pertes en EPI pour donner un surcroît d'o-quinone d'EPI (QEPI) tout en régénérant CG à partir de QCG. Cette réaction explique, dans un mélange CG et EPI, l'accélération de la dégradation d'EPI (réaction 2 + réaction 3) et le ralentissement de la dégradation de CG (réaction 1 – réaction 3). A cela s'ajoutent les réactions de dimérisation entre o-quinone et phénol d'origine (réactions 4 et 5 qui se produisent aussi avec un seul phénol) et les réactions de condensation pour former des codimères PCOND (réaction 6). Selon Forget-Richard (1990), en raison de la plus grande réactivité des QEPI (comparée à celle des QCG), celles-ci génèrent de plus grandes quantités de DIEPI et de PCOND que de DICG.

A 50 °C, l'ensemble de ces réactions sont accélérées, mais progressivement les réactions 1 et 2 sont ralenties du fait de la dénaturation progressive de la PPO.

Selon Janovitz-Klapp *et al.* (1990), il est possible de prévoir la vitesse totale de consommation d'oxygène (réaction 1 + réaction 2) dans un mélange binaire de phénols dans une solution saturée en air. Celle-ci répond à l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{m1} \cdot \frac{S1}{K_{m1}} + V_{m2} \cdot \frac{S2}{K_{m2}}}{1 + \frac{S1}{K_{m1}} + \frac{S2}{K_{m2}}}$$

avec  $V_{m1}$  et  $V_{m2}$ , vitesses maximales avec le phénol 1 et le phénol 2 respectivement,  $K_{m1}$  et  $K_{m2}$ , constantes de Michaelis du phénol 1 et du phénol 2 respectivement et  $S_1$  et  $S_2$ , concentrations du phénol 1 et du phénol 2 respectivement. Les constantes cinétiques sont des constantes apparentes déterminées pour dans de solutions saturées en air (soit 0,284 mM en oxygène à 20 °C)

Cette équation traduit une oxydation enzymatique indépendante des deux composés phénoliques, la répartition de l'enzyme entre ces deux substrats n'étant fonction que des constantes cinétiques de ces derniers (Janovitz-Klapp, 1989).

La vitesse de la réaction 1 est représentée par le terme :

$$(V_{m1} * S_1 / K_{m1}) / (1 + S_1 / K_{m1} + S_2 / K_{m2})$$

et celle de la réaction 2 par la seconde partie du numérateur soit le terme :

$$(V_{m2} * S_2 / K_{m2}) / (1 + S_1 / K_{m1} + S_2 / K_{m2}).$$

Bien évidemment, cette équation ne rend compte que de la consommation d'oxygène par voie enzymatique et ne prend pas en compte les réactions secondaires affectant les *o*-quinones et les phénols dont les vitesses ne sont pas connues. De plus, elle ne prend pas en compte l'effet de la concentration en oxygène sur les vitesses des réactions 1 et 2 et ne permet que la prévision des vitesses initiales de ces réactions dans des solutions saturées en air.

## II.3 Effet de l'ajout d'acide ascorbique

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux interactions entre l'acide ascorbique et la PPO. Pour cela, des études ont été réalisées en milieux modèles de tampon malate 20 mM à pH 3,8 en présence d'acide ascorbique et de PPO à 20 et 50 °C. Rappelons que la concentration initiale en acide ascorbique (5,6 mM) est celle déterminée dans le cadre du projet Tempantiox, ce composé étant rajouté par pulvérisation en amont du procédé de fabrication de la purée de pomme en vue de limiter les phénomènes de brunissement.

### *II.3.1 Stabilité de la PPO en présence d'AA*

Dans un premier temps, le suivi de l'activité enzymatique a été mené en présence d'une concentration initiale fixe d'AA (5,6mM) au cours d'incubations pendant 2 h à 20, 50 et 70 °C (**Figure 26**).

A 20 °C, la stabilité de l'activité PPO en présence ou en absence d'AA est similaire. Nous ne constatons pas d'effet de l'AA tout au long de l'incubation et l'activité PPO avec en moyenne une valeur d'activité résiduelle proche de 80 % après 120 min de contact à pH 3,8. A 50 °C, un faible écart d'activité PPO résiduelle apparaît après 30 min. En effet l'activité PPO résiduelle en présence d'AA reste en moyenne supérieure de 10 % à celle en absence d'AA à partir de 30 min de chauffage. A 70 °C, un effet similaire est observé entre 1 et 3 min de chauffage. Au-delà de cette durée, l'écart diminue puis s'annule puisque l'activité résiduelle décroît très rapidement à cette température.

Dans un second temps, pour analyser plus avant ce phénomène de protection de la PPO par l'AA, nous avons étudié l'effet de la concentration en AA entre 1 et 5,6 mM pour deux durées de traitement à 50 °C, 30 et 60 min. Les résultats obtenus sont présentés **figure 27**.

Au bout de 30 min de traitement à 50 °C, il n'y a pas d'effet significatif de la présence d'AA jusqu'à 4 mM, seule la concentration de 5,6 mM permet un léger gain d'activité résiduelle (un peu inférieur à 8 %). Cependant après 60 min de traitement à 60 °C, le gain apparaît dès la concentration de 2 mM (gain de 6 %) pour atteindre un peu moins de 15 % avec 5,6 mM d'AA.

L'origine de cet effet reste à expliquer. Il est possible que la présence d'une petite quantité de phénols oxydés dans l'extrait brut de PPO (déjà évoquée précédemment) soit responsable d'une augmentation de la thermosensibilité de la PPO présente dans cet extrait et que l'ajout d'AA ait un effet protecteur vis-à-vis de ces phénols oxydés.

L'AA pourrait interagir avec les phénols oxydés afin de les régénérer partiellement en phénols comme l'ont déjà montré Queiroz *et al.* (2010) avec la pomme. Ceci nous a conduits à déterminer dans les mêmes conditions de traitement (à 50 °C) l'impact de l'ajout d'AA sur deux autres types d'extrait enzymatique de PPO de pomme.

Une étude complémentaire des interactions entre l'acide ascorbique et la PPO de trois variétés de pomme différentes ainsi que de modes d'extraction différents a donc été mise en place. Pour cela nous avons mesuré et comparé en présence d'AA (5,6 mM), l'évolution des activités enzymatiques d'une PPO plastidiale issue de la variété Douce Cœt Ligné, celle d'une PPO pré-purifiée de Red Delicious et celle de l'extrait brut issu de Marie-Ménard utilisé dans tous nos essais, lors d'un traitement de 90 min à 50 °C (**Figure 28**).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de PPO plastidiale (variété Douce Cœt Ligné) et plus encore l'extrait de PPO prépurifié (variété Red Delicious) sont nettement plus thermosensibles que l'extrait brut (variété Marie-Ménard) que nous utilisons. Le manque de temps ne nous a pas permis de pousser plus avant afin de déterminer quelles sont les parts respectives de l'effet variétal et de la nature de l'extrait permettant d'expliquer ces différences de thermosensibilité. Par ailleurs, l'effet de l'ajout d'AA est différent ce dernier provoque une légère augmentation de la dénaturation de la PPO dans les extraits de PPO plastidiale et de PPO prépurifié contrairement aux résultats observés avec l'extrait brut de PPO (légère diminution de la dénaturation de l'activité PPO). Là encore, le manque de temps ne nous a pas permis de pousser plus avant nos investigations.

### ***II.3.2 Consommation de l'AA à 20 et 50 °C***

En parallèle du suivi de l'activité PPO, nous avons mesuré la concentration en acide ascorbique dans le milieu tout au long des 120 min de contact avec la PPO à 20 et 50 °C. Des essais en absence de PPO ont également été réalisés aux deux températures afin d'une part d'évaluer la thermostabilité de l'AA dans nos conditions expérimentales et d'autre part de juger de l'impact des interactions de ce dernier avec l'extrait brut sur cette thermostabilité.

La **figure 29** représente les concentrations d'AA résiduelles (% témoin) mesurées au cours de l'incubation avec ou sans PPO à 20 et 50 °C.

En absence de PPO, la dégradation de l'AA à 20 °C est très lente puisqu'après 120 min, la concentration résiduelle est supérieure à 90 % de la valeur initiale. Une accélération notable est observée à 50 °C où après le même temps la teneur résiduelle en AA est à peine supérieure à 70 %.

La réaction d'oxydation de l'AA en DHA en présence d'O<sub>2</sub> en est la première voie de dégradation et la température joue un rôle important pour accélérer cette oxydation (Deutsch, 1998). Deux stœchiométries sont proposées pour décrire d'oxydation de l'AA en présence d'oxygène. Elles conduisent toutes deux au DHA avec formation d'eau dans le premier cas ou de peroxyde d'hydrogène dans le second cas :

1. AA + ½ O<sub>2</sub> → DHA + H<sub>2</sub>O
2. AA + O<sub>2</sub> → DHA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. DHA + (?) O<sub>2</sub> → produits de dégradation

Au-delà de la formation du DHA, celui-ci subit des réactions de dégradation impliquant ou non l'oxygène et dont les mécanismes ne sont pas totalement élucidés. La réaction de dégradation de l'acide ascorbique est souvent décrite par une réaction cinétique de premier ordre vis-à-vis de ce dernier (Esteve *et al.*, 1998) tel que :

$$C = C_0 * \exp (- k_T * t)$$

avec C<sub>0</sub> concentration initiale en AA (mM), k<sub>T</sub> la constante de vitesse (s<sup>-1</sup>) et t le temps (s). La constante de vitesse k<sub>T</sub> est une constante de vitesse apparente obtenue en considérant que la concentration en oxygène est constante.

L'application de l'équation précédente à nos résultats donne des valeurs de k<sub>T</sub> égales à :

$$10^{-5} \text{ s}^{-1} \text{ à } 20 \text{ °C} \text{ et } 4,9 * 10^{-5} \text{ s}^{-1} \text{ à } 50 \text{ °C} \text{ en absence de PPO.}$$

En présence de PPO, l'AA se dégrade rapidement à 20 °C dans les 5 premières minutes, au-delà la cinétique de dégradation ralentit mais reste plus rapide qu'en absence de PPO. A 50 °C, la dégradation est encore plus rapide, avec toujours une diminution plus importante au début de la cinétique. Cette dégradation rapide dans la phase initiale pourrait être liée à la présence de phénols oxydés (sous forme d'o-quinones) dans l'extrait brut de PPO. Suite à l'ajout d'AA, la réduction immédiate des o-quinones régénèrent des o-diphénols substrats de la PPO. Il y a dès lors une consommation enzymatique d'oxygène formant des o-quinones qui par oxydation couplée redonnent les o-diphénols et oxydent l'AA en DHA (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990).

Si l'on ne tient pas compte du premier point de cinétique (où se produit une consommation immédiate d'AA), il est toujours possible de calculer les valeurs de constantes de vitesses apparentes  $k_T$  de dégradation de l'acide ascorbique à 50 °C en présence de l'extrait brut de PPO. Celles-ci sont égales à :

$$1,9 * 10^{-5} \text{ s}^{-1} \text{ à } 20 \text{ °C} \text{ et } 6,9 * 10^{-5} \text{ s}^{-1} \text{ à } 50 \text{ °C} \text{ en présence de PPO.}$$

ces valeurs prennent en compte le double effet des dégradations non enzymatique (effet thermique) et enzymatique (oxydation couplée) de l'AA.

## **II.4 Effet de l'ajout de produits de dégradation de l'acide ascorbique**

La dégradation importante de l'AA observée en milieu aqueux nous a amené à étudier l'impact que pourraient avoir certains de ses produits de dégradation sur l'activité enzymatique. Rappelons ici que notre étude s'effectue en milieu aérobie, avec une concentration initiale d'oxygène connue et constante et un pH fixé à 3,8. La suite de nos travaux sera donc limitée à l'étude des produits issus de la dégradation oxydative de l'AA (**Figure 8**) que sont l'acide déhydroascorbique (DHA), le 3 hydroxy-2-pyrone (3H2P) et l'acide furoïque (AF). En effet, les conditions ne sont pas réunies (milieu anaérobie, pH très faible  $\leq 2$ , présence de glucides, température élevée 90-130 °C) pour observer la formation de furfural et du 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) dans les traitements thermiques que nous avons appliqués à l'AA ajouté aux extraits de PPO (Bourgeois, 2003).

### ***II.4.1 Effet de l'ajout de DHA à 20 et 50 °C***

L'acide déhydroascorbique, premier produit de l'oxydation de l'acide ascorbique a été ajouté au milieu modèle à la même concentration que ce dernier (5,6 mM), afin de juger de son impact sur l'activité PPO. Cette concentration a été choisie en suivant l'hypothèse que tout l'AA ajouté en début de procédé est converti en DHA. L'effet d'une concentration intermédiaire (2,8 mM) a également été étudié.

La **figure 30**, présente l'évolution de l'activité PPO au cours du temps en absence ou en présence de DHA aux deux températures d'étude 20 (a) et 50 °C (b). Une accélération notable de la dénaturation de l'activité PPO est observée en présence de DHA aussi bien à 20 qu'à 50 °C. A 50 °C, l'accélération est particulièrement forte puisqu'après 30 min de contact, l'activité résiduelle est

inférieure à 10 % alors qu'elle est supérieure à 50 % en absence de DHA ajouté. Par ailleurs à 50 °C, l'accélération de la cinétique de dégradation de la PPO est dose dépendante puisqu'avec une concentration initiale en DHA divisée par deux (2,8 mM au lieu de 5,6 mM), la perte n'est plus que de 60 % après 30 minutes de contact (**Figure 30 b**).

Un effet similaire du DHA a été montré lors d'études sur l'hexokinase (Fiorani *et al.*, 2000) ou sur les protéases (Lockwood, 1997). Dans les deux cas, les capacités d'action du DHA au niveau des groupements thiols de la protéine en induisant des réticulations étaient mis en avant pour expliquer le pouvoir dénaturant du DHA sur les activités enzymatiques de ces protéines.

De récents travaux (Reihl *et al.*, 2004), réalisés en laboratoire sur des systèmes modèles lysine / arginine ont aussi permis de montrer la capacité du DHA à intervenir en tant qu'agent de glycation et ainsi formerait de nouvelles liaisons covalentes avec la lysine et / ou l'arginine. Ceci modifierait la conformation des protéines. Les travaux effectués par Fayle *et al.* (2000) ont montré une réticulation des protéines en présence de DHA et de ses produits de dégradation via l'interaction entre un résidu lysine libre et un composé carbonylé (réaction de Maillard). L'incubation à 37 °C d'une protéine modèle de type ribonucléase avec les produits de dégradation du DHA, couplée à une CLHP d'exclusion stérique a permis de montrer cette réticulation.

De plus, le DHA s'avérant très instable (Vemin *et al.*, 1998) en présence de protéines, la formation très rapide d'autres produits incluant le 2,3 acide dicétogulonique (Slight *et al.*, 1990), le thréose (Lopez et Feather, 1992), l'acide oxalique (Ortwerth *et al.*, 1994), le glyoxal (Schwarzenbolz *et al.*, 1997), le méthyl glyoxal (Larisch *et al.*, 1997) et le diacétyl glyoxal (Ledl et Schleicher, 1990) pourrait également être rendue responsable de la dénaturation observée. Cependant, l'acide oxalique ne présente pas d'effet sur la réticulation des protéines contrairement aux thréose, glyoxal, méthyl et diacétyl glyoxal qui dans le mélange réactionnel réagissent plus vite que le DHA avec la protéine.

D'autres travaux doivent néanmoins être réalisés afin de déterminer laquelle de ces réactions prédomine dans l'interaction du DHA avec les protéines et quels sont les acides aminés autres que la lysine pouvant être impliqués, et comment ces réactions affectent les propriétés fonctionnelles de la PPO et éventuellement d'autres protéines alimentaires.

#### *II.4.2 Effet de l'ajout d'autres produits de dégradation de l'AA à 20 et 50 °C*

Les conditions thermiques du procédé de fabrication des purées de pomme entraînent principalement la formation de produits de dégradation oxydative de l'AA, directement dérivés du DHA (Louarme, communication personnelle). Nous avons donc étudié l'impact de deux de ces produits, le 3 hydroxy-2-pyrone (3H2P) et l'acide furoïque (AF), sur l'activité PPO à 20 °C, afin de vérifier si ces 2 composés pouvaient être responsables (tout ou partie) de la dénaturation observée.

Les concentrations retenues pour ces deux composés, représentent les valeurs des concentrations minimales (33,3 µM) et maximales (100 µM) trouvées en moyenne sur un lot de purée de pomme issu du projet TEMPANTIOX, selon le type de traitement thermique utilisé (cold break, hot break, conserves France). La mesure de l'activité PPO en fonction de différentes concentrations en 3H2P et en AF est représentée **figure 31**.

Les résultats obtenus montrent que l'activité PPO n'est que très faiblement modifiée par l'ajout de ces composés aux deux concentrations testés. En conséquence, le 3H2P et l'acide furoïque ne peuvent pas être considérés comme responsables des effets de dénaturation de l'activité PPO.

Durant le procédé de fabrication des compotes et purées de pomme, l'acide ascorbique est ajouté en amont dès l'étape de broyage ou de râpuration des pommes, afin de limiter les phénomènes de brunissement. Ce composé que l'on sait instable en milieu aqueux, sensible à l'oxydation et à la température, conduit rapidement à la formation de produits secondaires. Il était donc important d'un point de vue technologique de connaître les interactions pouvant exister en amont et pendant les traitements thermiques entre la PPO et les produits de dégradation de l'acide ascorbique.

#### **IV. II.5 Effet de l'ajout de CG et / ou d'EPI et / ou d'acide ascorbique**

Pour comprendre et analyser les interactions entre les composés présents dans la pomme (CG et EPI) ou ajoutés (AA) et la polyphénoloxydase, avant sa dénaturation thermique liée au procédé, et après avoir étudié leurs effets séparément, nous avons analysé leurs effets lorsque CG, EPI et AA sont présents simultanément. Là encore, les effets ont été étudiés à deux températures (20 et 50 °C) sur une durée de 2 heures.

### ***II.5.1 Stabilité de la PPO en présence de CG, EPI et AA***

Un mélange ternaire composé de CG (0,56 mM), d'EPI (0,34 mM) et d'AA (5,6 mM) a été incorporé au milieu modèle à pH 3,8 en présence de PPO et incubé 120 min à 20 et à 50 °C. Notons que dans ce mélange, la concentration initiale en AA est 10 à 16 fois supérieure à celle des composés phénoliques.

Les résultats obtenus à 20 °C en présence de CG, EPI et AA sont identiques à ceux observés en présence d'AA seul (5,6 mM), soit une perte d'activité inférieure à 20 % après deux heures à 20 °C (résultats non montrés).

Les résultats obtenus à 50 °C en présence de CG, EPI et AA sont présentés dans la **figure 32**. La présence d'AA seul ou en mélange avec CG et / ou EPI empêche la chute d'activité initiale proche de 15 % (après 30 s de traitement) signalée dans la partie « études préliminaires ». Il est possible que l'AA ajouté élimine les phénols oxydés présents dans l'extrait brut de PPO qui seraient responsables de cette dénaturation dans la phase initiale du traitement à 50 °C. Au-delà de 45 min, l'ajout d'EPI provoque une légère augmentation de la perte d'activité PPO en présence d'AA alors qu'un effet inverse est observé avec CG et de façon encore plus marquée quand CG et EPI sont ajoutés simultanément. La comparaison de ces résultats avec ceux de la **figure 22** montrant les effets des ajouts de CG et / ou d'EPI sur la dénaturation de la PPO en absence d'AA permet de constater l'effet protecteur de l'ajout d'AA lorsque l'extrait brut de PPO est porté à 50 °C pendant 2 heures en présence de CG et surtout d'EPI. Sachant que l'ajout d'AA empêche l'accumulation de quinones QCG et QEPI (et des produits secondaires issus de ces quinones) pendant la réaction enzymatique, il est probable que l'effet protecteur constaté soit lié à cette propriété.

### ***II.5.2 Consommation de CG, EPI et AA***

En présence d'acide ascorbique (5,6 mM), aucune consommation de CG et d'EPI seuls ou en mélange n'est observée pendant 120 minutes aussi bien à 20 qu'à 50 °C. A la concentration d'AA utilisée, ce résultat était prévisible puisque les *o*-quinones de CG et d'EPI générées par l'oxydation enzymatique de ces phénols réagissent très rapidement pour redonner les phénols dont elles sont issues et oxyder l'AA en DHA (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990) selon les réactions suivantes :



Ces réactions viennent s'ajouter aux réactions décrites dans la **figure 25**. Etant très rapides, elles empêchent l'accumulation des *o*-quinones et de fait réduisent fortement les vitesses des réactions d'oxydation couplée, de dimérisation et de condensation entre *o*-quinones et phénols (réactions 3 à 6 de la **figure 25**), expliquant du même coup l'absence de consommation des phénols substrats (CG et EPI) dans nos conditions expérimentales.

La **figure 33** représente les pertes comparées en AA dans les milieux où il est seul et ceux où il est en présence de la PPO et du mélange CG et EPI, pendant 120 minutes à 20 et 50 °C. Il apparaît que l'ajout de PPO avec le mélange CG / EPI provoque une accélération de la dégradation de l'AA. Celle-ci est particulièrement nette à 20 °C puisque la teneur résiduelle en AA passe de 93 % lorsqu'il est seul à près de 55 % lorsque l'enzyme et ses substrats phénoliques sont ajoutés simultanément.

A 50 °C et toujours après 120 minutes de contact, le pourcentage résiduel d'AA passe de 72 à moins de 50 % lors de l'ajout de la PPO avec CG et EPI. Ce résultat attendu est évidemment lié à l'oxydation enzymatique des phénols qui produit des *o*-quinones qui ont la capacité d'oxyder l'AA en DHA en redonnant les phénols dont ils sont issus par les réactions 7 et 8. Ces réactions viennent s'ajouter aux réactions non enzymatiques de dégradation de l'AA aux températures testées.

## II.6 Effet de l'ajout de procyanidines de type B<sub>2</sub>

Dans la pomme, les procyanidines constituent quantitativement la classe la plus importante des phénols avant les dérivés hydroxycinnamiques et les monomères de catéchine et d'épicatéchine (Nicolas *et al.*, 1994). Parmi les procyanidines de la pomme, ce sont les procyanidines de type B<sub>2</sub> (polymères d'épicatéchine) qui sont majoritaires. Bien que ces composés phénoliques ne soient pas substrat direct de la PPO de pomme (Goodenough et Lea, 1979), cela justifie l'étude de leurs effets sur la stabilité de la PPO de pomme.

Le pouvoir inhibiteur de certains polymères de composés phénoliques sur les activités enzymatiques a été présenté lors de différentes études (Burton *et al.*, 1997 ; Le Bourvellec *et al.*, 2004). Selon Le Bourvellec *et al.* (2004), l'intensité de l'inhibition de la PPO par les procyanidines natives serait potentiellement fonction de leur degré de polymérisation.

Des essais ont été effectués à 20 et 50 °C dans un milieu modèle de tampon malate 20 mM à pH 3,8 avec une concentration en procyanidines de type B<sub>2</sub> (DPn = 9,7) égale à 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Les évolutions de l'activité PPO résiduelle pendant 45 minutes de contact sont reportées dans la **figure 34**.

Dès la première mesure (après 15 min de contact), une chute importante de l'activité est observée. Ainsi l'activité résiduelle n'est plus que de 25 % à 20 °C et est inférieure à 10 % à 50 °C. La prolongation du temps de contact provoque une diminution supplémentaire de telle sorte que l'activité résiduelle est inférieure à 5 % de l'activité initiale après 45 min à 20 ou à 50 °C. Ces niveaux sont à rapprocher des taux d'inhibition directe (sans contact préalable avec l'enzyme) observés par Le Bourvellec *et al.* (2004). Pour des concentrations en procyanidines de 0,5 gL<sup>-1</sup>, ces auteurs ont mesurés des taux d'inhibition compris entre 40 et 80 %, fonction du DPn des fractions de procyanidines testées.

Nous avons également observé l'apparition d'un précipité brun au cours du temps de contact avec la PPO en milieu acide (pH 3,8) à 20 °C mais pas à 50 °C. La coloration pourrait être liée à l'oxydation couplée des procyanidines (présence de composés phénoliques substrats dans l'extrait brut de PPO). Cette oxydation pourrait s'accompagner d'un effet de tannage des protéines (dont la PPO) présente dans le milieu. Ce phénomène a été montré lorsque la polyphénoloxydase se retrouve en contact des tannins, entraînant la formation de complexe tannin-protéine suivie de la précipitation de ces complexes. La complexation de différents systèmes enzymatiques a été observée avec les tannins condensés du champignon (Baharona *et al.*, 2005) ou du raisin (Gonçalves *et al.*, 2010).

L'interaction entre les protéines et les procyanidines a été étudiée en utilisant plusieurs approches techniques (Baxter *et al.*, 1997 ; Hagerman et Butler, 1981; Mateus *et al.*, 2003 ; Mueller-Harvey *et al.*, 2007 ; Papadopoulou *et al.*, 2005). Les connaissances actuelles indiquent que cette interaction est affectée par certains paramètres de la protéine (la taille, l'hydrophobicité, la flexibilité structurelle), des polyphénols (le degré de polymérisation, la flexibilité structurelle) et par l'environnement (température, pH, force ionique, présence de solvants organiques et présence de glucides) (Carvalho *et al.*, 2006).

D'autres essais tels que l'étude d'un effet dose des procyanidines de type B<sub>2</sub>, la comparaison entre les divers extraits enzymatiques de PPO sont à mener afin de pouvoir confirmer ces premiers résultats, estimer le réel pouvoir inhibiteur des procyanidines de type B<sub>2</sub> et le type d'interactions avec la PPO (forme des liaisons avec la protéine, action sur l'oxygène, ...).

## II.7 Effet de l'ajout de parois cellulaires

Au cours de l'élaboration de purée de pommes, les étapes de pressage et de traitement thermique sont largement responsables de la rupture de la paroi des cellules végétales. Cette rupture entraîne la mise en contact des divers composés de la pomme et notamment des composants de la paroi cellulaire avec la polyphénoloxydase.

Les interactions entre les parois cellulaires des pommes et les protéines telles que la PPO, sont encore mal connues.

Nos travaux visent à déterminer si la capacité d'adsorption de la paroi cellulaire montrée précédemment avec les procyanidines par Le Bourvelec *et al.* (2004) s'applique au cas de la polyphénoloxydase, ce qui pourrait limiter le brunissement enzymatique lors des procédés de fabrication de compote de pomme et ainsi en augmenter les qualités nutritionnelles et organoleptiques.

Les résultats reportés sur la **figure 35** montrent que l'activité PPO dans des milieux modèles contenant différentes concentrations en parois cellulaires (PC) évolue différemment au cours des 120 min de contact à 20 et à 50 °C. Il faut rappeler qu'au cours de ces essais, l'extrait de PC étant insoluble dans le milieu réactionnel contenu dans le tube Eppendorf, celui-ci était agité toutes les 5 min afin de permettre de fréquents contacts entre les parois cellulaires et les composants solubles du milieu. Les trois concentrations en PC choisies entre 0,5 et 2 g.L<sup>-1</sup> ont un impact variable sur l'activité PPO.

A 20 °C et quelle que soit la durée de contact entre 0 et 120 min, l'ajout des PC aux concentrations de 0,5 et de 2 g.L<sup>-1</sup> n'a aucun effet significatif sur l'évolution des activités PPO résiduelles. Seul, l'ajout des PC à la concentration de 1 g.L<sup>-1</sup> entraîne une diminution supplémentaire de l'activité comprise entre 10 et 15 % après 60 et 90 min de contact par rapport au témoin.

A 50 °C, la perte d'activité en présence de PC (entre 0,5 et de 2 g.L<sup>-1</sup>) est significativement accrue par rapport à celle mesurée en absence de PC et ce dès 30 min de contact. L'ajout de PC à la concentration de 1 g.L<sup>-1</sup> est celui qui occasionne l'effet le plus marqué sur l'activité résiduelle. Dès 15 min de contact, la diminution supplémentaire est de 10 % et la perte d'activité est quasi totale au bout de 120 min alors qu'avec le témoin l'activité résiduelle est proche de 30 %. Pour la concentration de 2 g.L<sup>-1</sup>, l'effet inhibiteur des PC est moins marqué, probablement en raison d'une plus mauvaise homogénéisation du milieu réactionnel.

Des études antérieures ont montré que les oligomères et les polymères de procyanidines peuvent se lier de façon non covalente aux parois cellulaires de pomme pendant des études d'incubation simple dans un tampon aqueux (Le Bourvellec *et al.*, 2005). Il est possible que la perte accrue de l'activité PPO soit due à une adsorption de l'enzyme sur l'extrait de PC ajouté à la solution contenant la PPO. Le mécanisme d'adsorption de la PPO dans la paroi cellulaire pourrait se rapprocher de celui présenté pour les procyanidines impliquant des associations faibles, plus précisément une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (Le Bourvellec *et al.*, 2004 ; Renard *et al.*, 2001).

En effet, cette adsorption peut avoir plusieurs conséquences qui toute conduite à une diminution de l'activité PPO mesurée. La première conséquence pourrait être que dans l'échantillon de volume prélevé du tube Eppendorf, les PC ne soient que partiellement représentées (et donc l'activité PPO adsorbée) par rapport à leur concentration moyenne dans le milieu réactionnel. La seconde conséquence pourrait être, pour une même quantité d'enzyme, une diminution de l'activité PPO adsorbée par rapport à l'activité PPO soluble. La troisième conséquence pourrait être une thermosensibilité accrue de la PPO adsorbée par rapport à la PPO soluble.

Nous avons étudié l'effet des PC sur un extrait enzymatique de forme plastidiale de la variété Douce Coët Ligné. Cet extrait PPO étant entouré et protégé par les « plastes », il nous semblait intéressant de comparer dans les mêmes conditions, l'activité PPO résiduelle en présence de PC.

La **figure 36** représente l'évolution comparée de l'activité enzymatique des deux extraits plastidial (Douce Coët Ligné) et brut (Marie-Ménard) en présence de PC à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  pendant 120 min de chauffage à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dans le cas de la PPO plastidiale « liée » aux plastes, l'ajout des PC n'a pas d'effet significatif sur l'évolution de l'activité PPO résiduelle. Cependant, la perte importante d'activité après 15 min de contact du témoin sans PC (plus de 75 % de pertes) ne permet d'en tirer une conclusion définitive. Il serait souhaitable soit de faire des prélèvements pour des temps plus courts ou de réaliser l'expérimentation à une température moins élevée.

## **II.8 Effet de l'ajout de purée de pommes**

Le milieu le plus complexe de notre étude est le milieu « purée de pomme » issue du procédé de fabrication COLD BREAK (**Figure 9**). Cette purée de pomme contient en concentrations variables les différents éléments primaires que nous avons successivement étudiés au préalable (glucides, phénols substrats de la PPO, procyanidines, phénols oxydés, acide ascorbique, produits de dégradation de l'acide ascorbique, parois cellulaires).

Cependant, du fait de l'ajout d'acide ascorbique au début du procédé de fabrication de la purée, il est probable que, dans celle-ci, la teneur en phénols non oxydés est encore importante, celle en phénols oxydés relativement faible et celle en produits de dégradation de l'acide ascorbique non négligeable.

Les essais suivants vont nous permettre d'estimer le devenir de la polyphénoloxydase au travers de tous ces constituants, en prenant notamment en compte l'effet de la température par un chauffage à 50 °C.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 37**, à laquelle nous avons ajouté ceux obtenus en présence de parois cellulaires à la concentration de 1 g.L<sup>-1</sup>. Il faut signaler que pendant l'incubation, nous avons observé un brunissement très rapide de la purée lors des quinze premières minutes de l'incubation avec la PPO aux deux températures d'étude. Ceci signifie d'une part que la teneur en phénols substrats de la purée est suffisante pour induire ce brunissement avec formation de phénols oxydés et d'autre part que la teneur en acide ascorbique est faible sinon nulle pour expliquer qu'il y ait brunissement.

A 20 °C, dès le premier prélèvement (après 15 min de contact), la perte d'activité PPO dépasse 40 % de l'activité initiale en présence de purée diluée. Par la suite, l'activité résiduelle évolue peu avec une perte supplémentaire inférieure à 10 % après 120 min de contact. A titre de comparaison, l'ajout de PC à 20 °C provoque une perte maximale de 25 % après 120 min de contact tout comme l'ajout d'EPI (**Figure 21**). De même, l'ajout de DHA (5,6 mM) entraîne une perte de 50 % pour la même durée de contact (**Figure 29**), mais celle-ci n'est pas immédiate et s'accroît avec le temps de contact.

A 50 °C, la perte initiale de 40 % est également observée après 15 min de contact, mais elle se poursuit de telle sorte que l'activité résiduelle est quasiment nulle après 120 min de contact à cette température. Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus avec l'ajout de PC à la concentration de 1 g.L<sup>-1</sup>, l'évolution de l'activité PPO est similaire. Notons qu'à 50 °C, les pertes en activité PPO sont aussi importantes en présence de ses phénols substrats (**Figure 21**) ou de DHA (**Figure 29**), qui sont des composés susceptibles d'être présents dans la purée utilisée.

# Conclusions et perspectives

Ce travail sur l'impact de la présence de constituants endogènes de la pomme (composés phénoliques, glucides, parois cellulaires) et de l'acide ascorbique sur la stabilité de la polyphénoloxydase de pomme au cours de traitements thermiques comportait plusieurs objectifs :

- établir les cinétiques de thermo-dénaturation d'un extrait brut de polyphénoloxydase de pomme dans un milieu modèle défini,
- étudier l'évolution de l'activité PPO en présence de phénols simples et / ou d'acide ascorbique au cours de traitements thermiques,
- étudier la stabilité de ces composants en fonction des différentes configurations expérimentales,
- confirmer le pouvoir inhibiteur des procyanidines B<sub>2</sub> sur l'activité PPO,
- déterminer l'impact d'une suspension de parois cellulaires sur l'activité PPO,
- évaluer le devenir de la PPO dans un milieu « produit ».

Ainsi, dans un premier temps, nous avons étudié la dénaturation d'un extrait brut de PPO issue de la variété de pomme Marie-Ménard, dans une solution de tampon malate 20 mM à pH 3,8 pour des traitements thermiques allant de 50 à 80 °C. Nous avons ainsi montré une inactivation totale de l'activité PPO en moins de 10 min pour des températures égales ou supérieures à 70 °C. L'énergie d'activation de dénaturation de la PPO dans ces conditions opératoires est proche de 190 kJ. mol<sup>-1</sup> ce qui correspond à une valeur de z égale à 11 °C et une valeur de Q<sub>10</sub> légèrement inférieure à 8.

Dans un second temps, le suivi de l'activité PPO en présence de CG (0,56 mM) et / ou d'EPI (0,34 mM) au cours de traitements thermiques à 50 °C a permis de mettre en évidence un effet dénaturant des produits d'oxydation des phénols sur l'activité PPO, et plus particulièrement des *o*-quinones d'EPI qui sont les plus agressives vis-à-vis de la PPO (moins de 2 % d'activité PPO résiduelle au bout de 120 min de contact en présence d'EPI). Par ailleurs, le suivi des consommations du CG et de l'EPI a permis notamment de confirmer que le CG est un meilleur substrat que l'EPI ainsi que l'existence de réactions d'oxydoréductions couplées entre phénols et *o*-quinones. Ces réactions d'oxydation couplée provoquent l'accroissement de l'oxydation de l'EPI et la réduction de celle de CG.

Les résultats d'activités PPO dans un milieu malate à 20 mM à pH 3,8 et en présence d'AA (5,6 mM), font apparaître un faible effet protecteur de l'activité PPO pendant un traitement de 120 min à 50 °C. Cependant, cet effet protecteur est remplacé par un effet dénaturant avec deux autres préparations de PPO (un extrait plastidial et un extrait prépurifié), ces deux préparations étant nettement plus thermosensibles que l'extrait brut qui nous a servi tout au long de travail. En parallèle, nous avons observé une dégradation accrue lorsqu'il est en contact avec l'extrait brut de PPO à 20 et 50 °C. Ce surcroît de dégradation est probablement dû à une oxydation couplée de l'AA en raison de la présence de phénols dans l'extrait brut de PPO.

Nous avons constaté un effet inhibiteur du DHA (5,6 mM), premier produit d'oxydation de l'AA, vis-à-vis de la PPO lorsqu'ils sont en contact dans une solution malate 20 mM à pH 3,8. Cet effet est particulièrement marqué à 50 °C avec une perte d'activité supérieure à 90 % après 30 min de contact. Il est possible que cet effet soit le résultat d'une action directe du DHA sur la conformation de la protéine enzymatique en favorisant la formation de ponts disulfures.

Par ailleurs, nos essais ont confirmé l'effet dénaturant des procyanidines de type B<sub>2</sub> sur la PPO de pomme en raison de la formation éventuelle de complexes inactifs avec l'enzyme soit directement soit après oxydation couplée mettant en jeu des composés phénoliques substrats de la PPO.

En outre, le suivi de l'incubation de la PPO pendant 120 min 50 °C dans une suspension de parois cellulaires à 1 g.L<sup>-1</sup> a mis en évidence une perte supplémentaire de l'activité PPO qui pourrait être due à une inactivation suite à une adsorption de l'enzyme sur les composés de la paroi végétale.

Enfin, l'incubation de l'extrait brut de PPO à 50 °C dans un milieu « purée de pomme diluée » a provoqué une perte rapide l'activité PPO accompagnée d'un brunissement. Le manque de temps ne nous a pas permis de déterminer l'importance des différents facteurs permettant d'expliquer ce résultat tels que la formation d'*o*-quinones agressives vis-à-vis de la PPO (cas de l'EPI en particulier), la présence de DHA, la formation de complexes avec les procyanidines de type B<sub>2</sub> et / ou les composants des parois cellulaires.

A l'issue de cette étude, il reste de nombreuses questions dont les réponses pourraient être obtenues par des travaux supplémentaires. Nous avons observé de très grandes différences de thermosensibilité de la PPO de pomme suivant la nature de l'extrait utilisé (extrait brut, extrait plastidial, extrait partiellement purifié). Il serait intéressant, en utilisant un extrait purifié, de vérifier que l'ajout de phénols substrats de l'enzyme (CG et / ou EPI) accroît la thermostabilité de l'enzyme.

De même, toujours avec un extrait purifié, observer l'impact de l'ajout contrôlé de phénols pour former des quantités connues de phénols oxydés sur la dénaturation et la thermosensibilité de la PPO permettrait de mieux comprendre le comportement de l'enzyme dans un extrait brut. Un travail similaire devrait être effectué avec des ajouts variables de DHA (nettement inférieurs aux quantités testées dans notre travail). Il reste également à déterminer si les effets dénaturants observés avec les procyanidines de type B<sub>2</sub> sont liés à la formation de complexes soit directement soit après oxydation couplée. Il serait intéressant de vérifier si les effets dénaturants observés sont réversibles ou non, cette dernière question concerne également l'effet des composants des parois cellulaires.

Il faut ajouter qu'une bonne connaissance des propriétés de thermosensibilité de la PPO dans la purée de pomme est indispensable pour prévoir l'impact des traitements thermiques sur l'évolution de cette activité dans ce milieu. Cependant, si l'objectif est de prévoir également le devenir des composés phénoliques et de l'acide ascorbique (et de ses produits de dégradation oxydative) au cours de ces mêmes traitements, il est non moins indispensable d'avoir également une bonne connaissance de la disponibilité de l'oxygène au cours du procédé. En effet, il faut rappeler que lors de la mesure d'une activité enzymatique, celle-ci se fait dans des conditions « optimales ». La valeur indiquée correspond à un potentiel d'activité et l'expression de ce potentiel dans un milieu donné dépendra des conditions physicochimiques (pH, force ionique, température, concentrations en composés phénoliques,...) dans lesquelles évolue l'enzyme. Parmi ces conditions, la concentration en oxygène constitue un élément clé pour déterminer la vitesse de la réaction enzymatique.

Enfin, une modélisation peut être mise en place afin de prédire l'évolution de la PPO, de l'oxygène, des composés phénoliques et de l'acide ascorbique dans des matrices de type purée de pomme soumises à des traitements thermiques (**Annexe 2**).

## Références bibliographiques

Ackerman J., Fischer M., Amado R. (1992). Changes in sugars, acids and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1131–1134.

Alonso-Salces R.M., Herrero C., Barranco A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. (2005). Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. *J. Food Chem.*, 93, 113-123.

Amiot M.J., Tacchini M., Aubert S., Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, 57, 958–962.

Amiot M.J., Aubert S., Nicolas J. (1993). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple and pear cultivars at maturity and postharvest. *Acta Hortic.* 343, 67–69.

AOAC (1990). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1058-1059.

Assiry A.M., Sastry S.K., Samaranayake C.P. (2006). Influence of temperature, electrical conductivity, power and pH on ascorbic acid degradation kinetics during ohmic heating using stainless steel electrodes. *Bioelectrochemistry*, 68, 7-13.

Awad M.A., Jager A. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of ‘Elstar’ and ‘Jonagold’ apples during and after regular and ultra-low oxygen storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 20, 15-24.

Ayaz F. A., Kadioglu A., Reunanen M., Var M. (1997). Phenolic acid and fatty acid composition in the fruits of *Laurocerasus officinalis* Roem. and its cultivars. *J. Food. Comp. Anal.*, 10, 350–357.

Barahona R., Sanchez S., Lascano C.E., Owenc E., Morris P., Theodorou M.K. (2005). Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enzyme Microbial. Technol.*, 39, 281–288

Baxter N.J., Lilley T.H., Haslam E., Williamson M.P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36, 5566–5577.

Bazhal, M., Vorobiev E. (2000). Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1668–1674.

Ben-Shalom N., Kahn V., Harel E., Mayer A.M. (1977). Olive catechol oxidase-changes during fruit development. *J. Sci. Food Agric.* 28, 545-550.

Billaud C., Regaudie E., Fayad N., Richard-Forget F., Nicolas J. (1995). Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidation catalyzed by apple polyphenol oxidase. In Enzymatic browning and its prevention, ACS Symposium Series 600, 295-312, Am. Chem Soc, Washington.

Billaud C., Roux E., Corbin A., Nicolas J., (2002). Inhibitory effect of Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with L-cysteine on enzymatic browning and

activity of polyphenoloxidase from apple and tyrosinase from mushroom. *Polyphenols communications*, 277-278.

Bissett O.W., Berry R.E. (1975). Ascorbic acid retention in orange juice as related to container type. *J. Food Sci.*, 40, 178-180.

Bourne M. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, Second ed. Ac Press, London.

Bourgeois C. (2003). Les vitamines In les Industries Agro-Alimentaires. Collection Sciences et Techniques Agro-Alimentaires. Tec et Doc. Editions Lavoisier, 712.

Buckow R., Weiss U., Knorr D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 441–448.

Burton S.G, Boshoff A., Edwards W., Rose P.D. (1998). Biotransformation of phenols using immobilised polyphenol oxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 5, 411-416.

Cabanes J., Chazarra S., Garcia-Carmona F. (2002). Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *J. Theor. Biol.*, 214, 321-325.

Cai Y., Lilley T.H., Haslam E., Gaffney S.H., Spencer C.M., Magnolato D. (1990). Polyphenol interactions, Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II*, 2197-2199.

Carvalho E., Póvoas M. J., Mateus N., de Freitas V. (2006). Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein–tannin interactions. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 891–896.

Castro I., Teixeira J. A., Salengke S., Sastry S. K., Vicente A. A. (2004). Ohmic heating of strawberry products: Electrical conductivity measurements and ascorbic acid degradation kinetics. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 5, 27–36.

Castro I., Macedo B., Teixeira J. A., Vicente, A. A. (2004). The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. *J. Food Sci.*, 69, 696–701.

Chanliaud E., Burrows K.M., Jeronimidis G., Gidley M.J. (2002). Mechanical properties of primary cell wall analogues. *Planta*, 215, 989–996.

Cheftel J.C., Cheftel H. (1976). Le brunissement enzymatique. In *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*. Tec. Doc., Lavoisier, 353-363.

Chen Q.X., Kubo I. (2002). Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4108-4112.

Chériot S. (2006). Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech, 2007, 271 p.

- Cheyrier V., Rigaud V., Moutounet M. (1989). High-performance liquid chromatographic determination of the free o-quinones of trans-caffeoyltartaric acid, 2-S-glutathionyl-caffeoyltartaric acid and catechin in grape must. *J. Chrom. Anal.*, 472, 428-432.
- Devaux M-F., Barakat A., Robert P., Bouchet B., Guillon F., Navez B., Lahaye M. (2005). Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. *Postharvest Biol. and Technol.*, 37, 209–221.
- Devic E., Guyot S., Daudin J.D., Bonazzi C. (2010). Effect of temperature and cultivar on polyphenols retention and mass transfer during osmotic dehydration of apples. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 606-614.
- Deutsch J.C. (1998). Spontaneous hydrolysis and dehydration of dehydroascorbic acid in aqueous solution. *Analyt. Biochem.*, 260, 223–229.
- Dijkstra L., Walker J.R.L. (1991). Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.*, 54, 229-234.
- Eicken C., Krebs B., Sacchettini J.C. (1999). Catechol oxidase - structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9, 677-683.
- Eison-Perchonok M.H., Downes T.W. (1982). Kinetics of ascorbic acid autoxidation as a function of dissolved oxygen concentration and temperature. *J. Food Sci.*, 47, 765–773.
- El-Beghiti K., Rabhi Z., Vorobiev E. (2005). Kinetic model of sugar diffusion from sugar beet tissue treated by pulsed electric field. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 213–218.
- Espin J.C., Wichers H.J. (1999). Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2638-2644.
- Espin J.C., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Varon R., Garcia-Canovas F. (1998). Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2968-2975.
- Esteve M.J., Frigola A., Martorell L., Rodrigo M.C. (1998). Kinetics of ascorbic acid degradation in green asparagus during heatprocessing. *J. Food Protection*, 61, 1518–1521.
- Fayle S.E., Gerrard J.A., Simmons L., Meade S.J., Reid E.A., Johnston A.C. (2000). Crosslinkage of proteins by dehydroascorbic acid and its degradation products. *Food Chem.*, 70, 193-198.
- Fiorani M., De Sanctis R., Scarlatti F., Vallorani L., De Bellis R., Serafini G., Bianchi M., Stocchi V. (2000). Dehydroascorbic acid irreversibly inhibits hexokinase activity. *Mol. Cell. Biochem.*, 209, 145-153.
- Funke I., Melzig M.F. (2005). Effect of different phenolic compounds on  $\alpha$ -amylase activity: Screening by microplate-reader based kinetic assay. *Pharmazie*, 60, 796–797.
- Golan-Goldhirsh A., Whitaker J.R. (1984). Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1003-1009.

- Goldbeck J.H., Cammarata K.V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, 67, 977-984.
- Gonçalves R., Soares S., Mateus N., de Freitas V. (2007). Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7596–7601.
- Goodenough P.W., Lea A.G.H. (1979). Oxidation of cider procyanidins by apple oxidase systems. *Ann. Rept. Long Ashton Res. Stn.*, 22, 207–214.
- Green B.G. (1993). Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica*, 84, 119–125.
- Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drilleau J.F. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1698-1705.
- Guyot S., Marnet N., Drilleau J.F. (2001). Thioacidolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerisation state. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 14-20.
- Guyot S., Le Bourvelec C., Marnet N., Drilleau J.F. (2002). Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apple maturity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 35, 289-291.
- Guyot S., Marnet N., Sanoner P., Drilleau, J.F. (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6240–6247.
- Hagerman A.E., Butler L.G. (1981). The specificity of proanthocyanidin–protein interactions. *J. Biol. Chem.*, 256, 4494–4497.
- Harel E., Mayer A.M., Shain, Y. (1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant.*, 17, 921-930.
- Harel E., Mayer A.M., Lerner H.R. (1970). Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 542-544.
- Heimdal H., Rasmus B. (1997). [Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by multiway methods](#). *Chemo. Intel. Labo. Syst.*, 34, 85-102.
- Jackman R.L., Stanley D.W. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 187–194.
- Janovitz-Klapp A.H. (1989) Étude sur le système polyphénoloxydasique isolé de la pomme (*Malus sylvestris*, Var. Red Delicious). Thèse de Doctorat, Université Paris 7, 208p.
- Janovitz-Klapp A.H., Nicolas J.J., Richard F.C., Goupy P.M. (1990) Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 926-931.
- Jeantet R., Baron F., Nau F., Roignant M., Brulé G. (1999). High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *J. Food Protection*, 62, 1381–1386.

- Jia , Zhang Q.H., Min D.B (1999). Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chem.*, 65, 445-451.
- Jimenez M., Garcia-Carmona F. (1997). 4-substituted resorcinols (sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase and catecholase activity. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2061-2065.
- Kacem B., Cornell J., Marshall M.R., Shireman R.B., Matthews R.F. (1987). Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange drink: effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen. *J. Food Sci.*, 52, 1668-1672.
- Kahn V., Andrawis A. (1985). Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry*, 24, 905-908.
- Kahn V., Lindner P., Zakin V. (1995). Effect of kojic acid on the oxidation of o-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, 18, 253-271.
- Kanner J., Fishbein J., Shalom P., Harel S., Bengera I. (1982). Storage of orange juice concentrate packaged aseptically. *J. Food Sci.*, 47, 429-436.
- Knorr D., Geulen M., Grahl T., Sitzmann W. (1994). Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 71-75.
- Kunzek H., Kabbert R., Glona D. (1999). Aspects of material science in food processing: changes in plant cell walls of fruits and vegetables. *Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 208, 233-250.
- Kurata T., Sakurai Y. (1967). Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. Part I. *Agric. Biol. Chem.*, 31, 101-105.
- Larisch B., Pischtrider M., Severn T. (1996). Reactions of dehydroascorbic acid with primary amines including N-a- acetyl lysine. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1630-1634.
- Larisch B., Pischtrider M., Severn T. (1997). Formation of gaunosine adducts from l-ascorbic acid under oxidative conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 2681-2686.
- Laurila E., Kervinen R., Ahvenainen, R. (1998). The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. Review article. *Postharv. News Info.*, 9, 53-66.
- Lea, A.G.H., Arnold, G.M. (1978). The phenolics of ciders : bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.*, 29, 478.
- Le Bourvellec C., Bouchet B., Renard C.M.G.C. (2005). Noncovalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1725, 10-18.
- Le Bourvellec C., Guyot S., Renard C.M.G.C. (2005). Interactions between apple (*Malus x domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 75, 251-261.

Le Bourvellec C., Guyot S., Renard, C.M.G.C. (2004). Non-covalent interaction between procyanidins and cell wall material. Part I: Effect of some physicochemical parameters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1672, 192–202.

Le Bourvellec C., Le Quéré J.M., Sanoner P., Drilleau J.F., Guyot S. (2004). Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 122-130.

Le Bourvellec C., Le Quéré J.M., Renard C.M.G.C. (2007). Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: Studies in model suspensions and application. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7896-7904.

Ledl F., Schleicher E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem.*, 29, 565-594.

Lee C.Y., Kagan V., Jaworski A.W., Brown S.K. (1990). Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 99-101.

Lee C.Y., Kirk J.R., Bedford C.L., Heldman D.R. (1977). Kinetics and computer simulation of ascorbic acid stability of tomato juice as a function of temperature, pH, and metal catalyst. *J. Food Sci.*, 42, 640– 648.

Lee, C.Y., Mattick, L.R. (1989). Composition and nutritive value of apple products. In: Downing DL, editor. Processed apple products, 303-321.

Lee H.S., Nagy S. (1988). Quality changes and nonenzymic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *J. Food Sci.*, 53, 168-180.

Leistner L. (1995). Principles and applications of hurdle technology in food processing : Recent advances. In: New Methods for Food Preservation by Moisture Control, Gould, G.W. (Ed), Blackie Academic and Professional, 1-21.

Leizerson S., Shimoni E. (2005). Effect of ultrahigh-temperature continuous ohmic heating treatment on fresh orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3519–3524.

Lerch K. (1981). Metal ions In biological systems, Sigel H. (Ed), Marcel Dekker 13, 143-186.

Levine M., Morita K. (1985). Ascorbic acid in endocrine systems. In Vitamins and Hormones. Ac Press Inc., 42, 1-64.

Lima M., Heskitt B.F., Sastry S.K. (2001). Diffusion of beet dye during electrical and conventional heating at steady-state temperature. *J. Food Process Eng.*, 24, 331–340.

Lockwood T.D. (1997). Inactivation of intracellular proteolysis and cathepsin B enzyme activity by dehydroascorbic acid and reactivation by dithiothreitol in perfused rat heart. *Biochem. Pharmacol.*, 54, 669-675.

Lopez M.G., Feather M.S. (1992). The production of L-threose as a degradation product from L-ascorbic acid. *J. Carbohydr. Chem.*, 11, 799-806.

- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. (1990). In Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton, 295-322.
- Maillard L.C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 154, 66-68.
- Marques L., Fleuriet A., Macheix J.J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol.*, 33, 193-200.
- Martinez M.V., Whitaker J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 195-200.
- Massaioli D., Haddad P.R. (1981). Stability of the vitamin C content of commercial orange juice. *Food Technol. Aus.*, 33, 136-138.
- Mateus N., Carvalho E., de Freitas V. (2003). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analyt. Chim. Acta*, 1, 135-140.
- Mayer A.M. (1987). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- Mayer A.M., Harel E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, 193-215.
- Mayer A.M., Harel E. (1991). Phenoloxidases and their significances in fruit and vegetables. In Food Enzymology. P.F. Fox (Ed.). Elsevier Appl. Sci., 323-398.
- McDougall G.J., Shipiro F., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2760-2766.
- Mc Dougall G.J., Stewart D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23, 189-195.
- Mc Evily A.J., Iyengar R., Otwell W.S., (1991). Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technol.*, 45, 80-86.
- Mc Evily A.J., Iyengar R., Otwell W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.*, 60, 331-337.
- Moll M., Moll N. (1998). Les autres additifs, les antioxygènes. In Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques, Second ed, série Agro-Alimentaire. Dunod, 89-99.
- Monsalve-Gonzales A., Barbosa-Canovas G.V., Cavalieri R.P., Mc Evily A.J., Iyengar R. (1993). Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-hexylresorcinol as anti-browning agent. *J. Food Sci.*, 58, 797-800.

- Moreno D., Ilic N., Poulev A., Brasaemle D.L., Fried S.K., Raskin I. (2003). Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, 19, 876–879.
- Mueller-Harvey I., Mlambo V., Sikosana J.L.N., Smith T., Owen E., Brown R.H.(2007). Octanol–water partition coefficients for predicting the effects of tannins in ruminant nutrition. *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 5436–5444.
- Murata M.,Tsurutani M., Hagiwara S., Homma S. (1997). Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1495-1499.
- Nappi A.J., Vass E. (1994). Chromatographic analyses of the effects of glutathione, cysteine and ascorbic acid on the monophenol and diphenol oxidase activities of tyrosinase. *J. Liquid Chromatogr.*, 17, 793-815.
- Nicolas J., Richard-Forget F., Goupy P.M., M.J.Amiot, Aubert S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.
- Nicolas J., Billaud C., Rouet-Mayer M-A., Philippon J. (2003). Enzymatic browning Technical aspects and assays, In: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Ac Press., 686-692.
- Ohtsuru M., Hata T. (1979). [The interaction of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase](#). *Biochim. Biophys. Acta - Enzymology*, 567, 384-391.
- Ortwerth B.J., Speaker J.A., Prabhakaram M., Lopez M.G., Li E. Y., Feather M.S. (1994). Ascorbic acid glycation: the reactions of L-threose in lens tissue. *Experim. Eye Res.*, 58, 665-674.
- Papadopoulou A., Green R.J., Frazier R.A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 158–163.
- Pataro G., Donsi G., Ferrari G. (2011). Aseptic processing of apricots in syrup by means of a continuous pilot scale ohmic unit. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 44, 1546-1554.
- Perez-Illarbe J., Henandez T., Estrella I. (1991). Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Lebensm. Unters. Forsch.* 192, 551-554.
- Piette G., Buteau M.L., de Halleux D., Chiu L., Raymond Y., Ramaswamy H.S., Dostie M. (2004). Ohmic cooking of processed meats and its effects on product quality. *J. Food Sci.*, 69, 71–78.
- Pitt R.E. (1982). Models for the rheology and statistical strength of uniformly stressed vegetative tissue. *Trans. ASAE*, 25, 1776–1784.
- Pitt R.E., Chen H.L. (1983). Time-dependent aspects of the strength and rheology of vegetative tissue. *Trans. ASAE*, 26, 1275–1280.
- Qin B.L., Pothakamury U.R., Vega H., Martin O., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. (1995). Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.*, 49, 55–60.

- Quast D.G., Karel M. (1972). Computer simulation of storage life of foods undergoing spoilage by two interacting mechanisms. *J. Food Sci.*, 37, 679-683.
- Queiroz C., Silva A.J.S, Lopes M., Fialho E., Valente-Mesquita V.L. (2010). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chem.*, 125, 128–132.
- Quiles A., Hernado I., Pérez-Munuera I. (2005). Polyphenoloxidase (PPO) activity and osmotic dehydration in Granny Smith apple. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 1017-1020.
- Rasmussen S.E., Frederiksen H., Struntze-Krogholm K., Poulsen L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 159–174.
- Reihl O., Lederer M.O., Schwack W. (2004). Characterization and detection of lysine–arginine cross-links derived from dehydroascorbic acid. *Carbohydr. Res.*, 339, 483–491.
- Renard C.M.G.C., Baron A., Guyot S., Drilleau J.F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *Int. J. Bio. Macro.*, 29, 115–125.
- Richard-Forget F. (1992). Recherches sur le brunissement enzymatique. Etudes sur l'oxydation de phénols et sur l'inhibition de la polyphénoloxydase de la pomme (*Malus sylvestris*, Var. Red Delicious). Thèse de Doctorat, Université Paris 7, 278 p.
- Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Nicolas J.J. (1992). Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2108-2113.
- Rivas N.J., Whitaker J.R. (1973). Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiol.*, 52, 501-507
- Robertson G.L., Samaniego C.M.L. (1986). Effect of initial dissolved-oxygen levels on the degradation of ascorbic-acid and the browning of lemon juice during storage. *J. Food Sci.*, 51, 184–187.
- Rocha A.M.C.N., Morais A.M.M.B., (2001). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, 12, 85-90.
- Rodriguez-Lopez J.N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, 267, 3801-3810.
- Rojas A.M., Gerschenson L.N. (1997). Ascorbic acid destruction in sweet aqueous model systems. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30, 567-572.
- Sale A.J.H., Hamilton W.A. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. [\*Biochim. Biophys. Acta\*](#), 148, 781-788.
- Sapers G.M., (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technol.*, 47, 75-83.

- Sapers G.M., El-Atawi Y.S., Hicks K.B., Garzarella L. (1989). Effect of emulsifying agents on inhibition of enzymatic browning in apple juice by ascorbyl palmitate, laurate and decanoate. *J. Food Sci.*, 54, 1096-1097.
- Sanoner P., Guyot S., Marnet N., Molle D., Drilleau J-F. (1999). Polyphenols profiles of French cider apple varieties (*Malus domestic asp*). *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 4847-4853.
- Schieber A., Keller P., Carle R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. Anal.*, 910, 265-273.
- Schwarzenbolz U., Henle T., Haebner R., Klostermeyer H. (1997). On the reaction of glyoxal with proteins. *Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 205, 121-124.
- Shibusawa Y., Yanagida A., Ito A., Ichihashi K., Shindo H., Ito Y. (2000). High-speed counter-current chromatography of apple procyanidines. *J. Chrom. Anal.*, 886, 65-73.
- Shinoda Y., Komura H., Homma S., Murata M. (2005). Browning of model orange juice solution: Factors affecting the formation of decomposition products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2129-2137.
- Shoji T., Mutsuga M., Nakamura T., Kanda T., Akiyama H., Goda Y., (2003). Isolation and structural elucidation of some procyanidines from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3806-3813.
- Solomon O., Svanberg U., Sahlström A. (1995). Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8 °C. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 363-368.
- Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, 96, 2563-2605.
- Soysal C. (2008). Kinetics and thermal activation / inactivation of starring apple polyphenol oxidase. *J. Food Process. Preserv.*, 32, 1034-1046.
- Slight S.H., Feather M.S., Ortwerth B.J. (1990). Glycation of lens proteins by the oxidation products of ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1038, 367-374.
- Torregrosa F., Cortés C., Esteve M.J., Frígola A. (2005). Effect of high intensity pulsed electric fields processing and conventional heat treatment on orange-carrot juice carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9519-9515.
- Vamos-Vigyazo L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 49-127.
- Van den Broeck .I, Ludikhuyze L., Weemaes C., Van Loey A., Hendrickx M. (1998). Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-Ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2001-2006.
- Van Gelder C.W.G., Flurkey W.H. et Whichers H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.

- Vanstreels E., Alamar M.C., Verlinden B.E., Enninghorst A., Loodts J.K.A., Tijssens E., Ramon H., Nicolai B.M. (2005). Micromechanical behaviour of onion epidermal tissue. *Postharvest Biol. Technol.*, 37, 163–173.
- Varoquaux P., Sarris J. (1979). Influence de l'acide ascorbique sur la cinétique de l'o-diphénolase (EC 1.14.18.1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Lebensm. Wissen. Technol.*, 12, 318-320.
- Vemin G., Chakib S., Rogacheva S.M., Obretenov T.D., Paranyi C. (1998). Thermal decomposition of ascorbic acid. *Carbohydr. Res.*, 305, 1-15.
- Verceta A., Burgos J., Crelier S., Lopez-Buesa P. (2001). Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2, 139-150.
- Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters, E.J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 564–573.
- Vikram V.B., Ramesh M.N., Prapulla S.G. (2005). Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *J. Food Eng.*, 69, 31–40.
- Villota R., Karel M. (1980). Prediction of ascorbic acid retention during drying. I. Moisture and temperature distribution in a model system. *J. Food Process. Preserv.*, 4, 111-134.
- Voragen A.G.J., Beldman G., Schols H.A. (2001). Chemistry and enzymology of pectins. In: *Advances in Dietary Fibre Technology*, McCleary B.V., Prosky L. (Eds), Blackwell Press, 379-379.
- Waldron K.W., Parker M.L., Smith A.C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews Food Sci. Food Saf.*, 2, 101–119.
- Walker J. R. L., Ferrar P. H. (1995). The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.*, 836-839.
- Wang W.C, Sastry S.K. (2002). Effects of moderate electrothermal treatments on juice yield from cellular tissue. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 371–377.
- Weemaes C.A., Ludikhuyze L.R., Van Den Broeck I., Hendrickx M.E., Tobback P.P. (1998). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxydases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm. Wissen. Technol.*, 31, 44–49.
- Whitaker J., Lee C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*, Whitaker J., Lee C.Y. (Eds). ACS symposium series 600, American Chem. Soc., 2-7.
- Whitaker J.R., Martinez M.V. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 195-200.

- Wilcox D.E., Porras A.G., Hwang Y.T., Lerch K., Winkler M.E., Solomon E.I. (1985). Substrate analog binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4015-4027.
- Williams D.C., Lim M.H., Chen A.O., Pangborn R.M., Whitaker J.R. (1986). Blanching of vegetables for freezing-which indicator enzyme to choose. *Food Technol.*, 40, 130-140.
- Wise R.R., Naylor A.W. (1985). Calibration and use of a Clark-type oxygen electrode from 5 to 45 °C. *Analyt. Biochem.*, 146, 260-264.
- Wu J., Gao H., Zhao L., Liao X., Chen F., Wang Z., Hu X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem.*, 103, 88–93.
- Yemenicioglu A., Ozkan M., Cemeroglu B. (1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. *J. Food Sci.*, 62, 508–510.
- Yildiz H., Baysal T., Icier F. (2006). Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. *J. Food Eng.*, 74, 424–429.
- Yildiz H., Baysal T., Icier F. (2008). Polyphenoloxidase deactivation kinetics during ohmic heating of grape juice. *J. Food Eng.*, 85, 410–417.
- Yuan J.P., Feng C. (1998). Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5078-5082.
- Zawistowski J., Biliaderis C.G., Eskin N.A.M. (1991). Polyphenoloxidase. In *Oxidative enzymes in foods*. Robinson D.S.R., Eskin N.A.M. (Eds), Elsevier Applied Sci., 217-273.
- Zawistowski J., Weselake R.J., Blank G., Murray E.D. (1987). Fractionation of Jerusalem artichoke phenolase by immobilized copper affinity chromatography. *Phytochemistry*, 26, 2905-2907.
- Zdunek A., Konstankiewicz K. (2004). Acoustic emission in investigation of plant tissue micro-cracking. *Trans. ASAE*, 47, 1171–1177.
- Zdunek A., Umeda M. (2005). Influence of cell size and cell wall volume fraction on failure properties of potato and carrot tissue. *J. Text. Stud.*, 36, 25–43.
- Zdunek A., Umeda, M. (2006). Extension and fracture of cell walls after parenchyma tissue deformation. *Biosystems Engineering*, 93, 269–278.
- Zhou H., Feng X. (1991). Polyphenol oxidase from Yali pear. *J. Sci. Food Agric.*, 57, 307-313.
- Zhou P., Smith N.L., Lee C.Y. (1993). Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 532-536.

## Liste des tableaux

### Chapitre 1 : TRAVAUX ANTÉRIEURS

**Tableau I** : Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de Mc.Evily, Iyengar et *al.*, 1992).....11

**Tableau II** : Teneur en constituants de diverses variétés de pommes (adapté) de (Wu, Gao et al., 2006).....13

### Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

**Tableau III** : Quantité d'acide chlorogénique et des produits de dégradation de l'acide ascorbique dans 100g de compote.....30

**Tableau IV** : Longueur d'onde de détection, temps de rétention, LD, LQ et CR des standards.....40

### Chapitre 3 : RÉSULTATS

**Tableau V** : Mesure de l'activité enzymatique de deux variétés de pomme par polarographie.....43

**Tableau VI** : Comparaison des EB de Golden Delicious et de Marie-Ménard avec divers substrats phénoliques dans du Tampon Mc Ilvaine pH 4,5 à 30°C.....43

**Tableau VII** : Contenu initial en acide chlorogénique (CG = 0,56 mM), en (-)-épicatéchine (EPI = 0,34 mM), en acide ascorbique (AA = 5,6 mM) et en oxygène dans les tubes Eppendorf fermés à 20 °C avec 0,75 ou 1,5 mL de phase liquide (les calculs sont explicités dans la partie matériel et méthodes).....44

**Tableau VIII** : Paramètres de thermosensibilité de l'extrait brut de PPO de pomme (variété Marie-Ménard), constantes de vitesse k, D, Energie d'activation, z et Q<sub>10</sub> entre 50 et 70 °C.....47

## Liste des figures

### Chapitre 1 : TRAVAUX ANTÉRIEURS

<b>Figure 1</b> : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases.....	6
<b>Figure 2</b> : Figure.2 : Effets de la cystéine (Cy-SH) sur l'oxydation enzymatique d'o-diphénols (d'après Richard-Forget, 1992).....	11
<b>Figure 3</b> : Composition du milieu modèle issu du projet TEMPANTIOX.....	12
<b>Figure 4</b> : Mécanismes réactionnels de l'oxydation enzymatique et non enzymatique du CG et de l'EPI.....	15
<b>Figure 5</b> : Structure de la catéchine, de l'épicatéchine et des procyanidines B1, B2 et C1 (Shibusawa, Yanagida et al., 2000).....	17
<b>Figure 6</b> : Mécanisme d'action de l'acide ascorbique en présence de phénols et de PPO.....	19
<b>Figure 7</b> : Oxydation de l'acide ascorbique (AA) en acide déhydroascorbique (DHA).....	20
<b>Figure 8</b> : Mécanisme et produits de dégradation de l'AA en présence d'oxygène.....	22
<b>Figure 9</b> : Procédés de fabrication de la purée de pomme.....	23

### Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>Figure 10</b> : Polarographe automatisé avec sonde à oxygène BERNSTEIN et équipé du logiciel de traitement du signal DATASTUDIO.....	33
<b>Figure 11</b> : Protocole expérimental.....	37
<b>Figure 12</b> : Exemple de spectre d'absorption de l'AA en solution dans du tampon malate 20 mM à pH 3,8.....	39
<b>Figure 13</b> : Exemples de chromatogrammes obtenus en CLHP-DAD pour le 3H2P (295 nm), le 5HMF (285 nm), l'AF (253 nm) et le furfural (278 nm).....	40

### Chapitre 3 : RÉSULTATS

<b>Figure 14</b> : Comparaison de l'activité PPO résiduelle mesurée au cours du chauffage à 60 °C pendant 2 h lorsque le tube est fermé ou ouvert.....	43
<b>Figure 15</b> : Comparaison de l'activité PPO résiduelle mesurée au cours du chauffage à 60 °C pendant 2 h pour des volumes aqueux réactionnels variables (0,75 ou 1,5 mL).....	44
<b>Figure 16</b> : Evolution de l'activité PPO en fonction de la température (30-70 °C) et de la durée de chauffage (0 -180 min) dans un milieu de tampon malate 20 mM à pH 3,8.....	45
<b>Figure 17</b> : Log de l'activité PPO résiduelle en fonction du temps de chauffage (0-180 min) à différentes températures (30-70 °C).....	47
<b>Figure 18</b> : Ln k en fonction de 1/T aux différentes températures de chauffage (30-70 °C).....	48
<b>Figure 19</b> : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 à 20 et 50 °C en absence ou en présence de sels...50	
<b>Figure 20</b> : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 à 20 et 50 °C en absence ou en présence de glucides.....	50
<b>Figure 21</b> : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 en absence ou en présence de CG et / ou d'EPI à 20 °C.....	51
<b>Figure 22</b> : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 en absence ou en présence de CG et / ou d'EPI à 50 °C.....	51
<b>Figure 23</b> : Evolution à 20 °C de la teneur en CG et EPI seuls ou en mélange en absence (a) ou en présence (b) de PPO.....	52
<b>Figure 24</b> : Evolution à 50 °C de la teneur en CG et EPI seuls ou en mélange, en absence (a) ou en présence (b) de PPO.....	52
<b>Figure 25</b> : Réactions enzymatiques et non enzymatiques impliquant CG et EPI et leurs o-quinones.....	53
<b>Figure 26</b> : Evolution de l'activité PPO en absence ou en présence d'AA (5,6 mM) à 20, 50 et 70 °C pendant des temps de contact variables (0-120 min).....	55
<b>Figure 27</b> : Evolution de l'activité PPO en présence d'une concentration variable en AA (1-5,6 mM) à 50 °C pendant 30 et 60 min de contact.....	56
<b>Figure 28</b> : Evolution de l'activité PPO à 50 °C de différentes formes enzymatiques (extrait brut de PPO plastidial, de PPO soluble et extrait de PPO prépurifié) en absence ou en présence d'AA (5,6 mM).....	56
<b>Figure 29</b> : Concentration résiduelle en AA en absence ou en présence de PPO à 20 et 50 °C.....	57
<b>Figure 30</b> : Evolution de l'activité PPO résiduelle en absence ou en présence de DHA à 20 °C (a) et à 50 °C (b).....	59
<b>Figure 31</b> : Mesure de l'activité PPO en présence de 2 composés issus de la dégradation oxydative de l'AA: 3H <sub>2</sub> P ou acide furoïque (AF).....	60

<b>Figure 32</b> : Evolution de l'activité PPO résiduelle à 50 °C dans un mélange d'AA (5,6 mM), de CG (0,56 mM) et d'EPI (0,34 mM).....	61
<b>Figure 33</b> : Concentration résiduelle en AA dans le mélange (CG-EPI-AA) en présence de PPO à 50 °C.....	62
<b>Figure 34</b> : Activité PPO résiduelle en absence ou en présence de procyanidines B <sub>2</sub> (Prc) à 0,5 g.L <sup>-1</sup> à 20 et 50 °C.....	63
<b>Figure 35</b> : Evolution de l'activité PPO pour des concentrations variables en parois cellulaires (PC, 0,5 g/L à 2 g/L) à 20 °C (a) et 50 °C (b).....	64
<b>Figure 36</b> : Evolution de l'activité PPO en présence de parois cellulaires 1g.L <sup>-1</sup> à 50°C. Effet de l'origine et du mode de préparation de la PPO.....	66
<b>Figure 37</b> : Comparaison activités PPO résiduelles en milieu purée et en milieu paroi cellulaire à 1 g/L à 20 et 50 °C.....	67

**ANNEXE 1 : Table de Winkler adapté de « *PROTEC TRAITEMENT DES EAUX* »  
SOLUBILITÉ DE L'OXYGÈNE DANS L'EAU EN FONCTION DE LA  
TEMPÉRATURE**

<b>Température (°C)</b>	<b>Solubilité O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Solubilité O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Solubilité O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>0</b>	14,56	34	7,02	<b>68</b>	3,99
<b>1</b>	14,16	35	6,91	<b>69</b>	3,9
<b>2</b>	13,78	36	6,8	<b>70</b>	3,81
<b>3</b>	13,42	37	6,7	<b>71</b>	3,71
<b>4</b>	13,06	38	6,6	<b>72</b>	3,62
<b>5</b>	12,73	39	6,5	<b>73</b>	3,52
<b>6</b>	12,41	40	6,41	<b>74</b>	3,43
<b>7</b>	12,11	41	6,31	<b>75</b>	3,32
<b>8</b>	11,81	42	6,22	<b>76</b>	3,23
<b>9</b>	11,52	43	6,12	<b>77</b>	3,13
<b>10</b>	11,25	44	6,03	<b>78</b>	3,03
<b>11</b>	10,99	45	5,94	<b>79</b>	2,92
<b>12</b>	10,75	46	5,85	<b>80</b>	2,81
<b>13</b>	10,5	47	5,76	<b>81</b>	2,7
<b>14</b>	10,28	48	5,67	<b>82</b>	2,59
<b>15</b>	10,06	49	5,59	<b>83</b>	2,43
<b>16</b>	9,85	50	5,5	<b>84</b>	2,36
<b>17</b>	9,65	51	5,42	<b>85</b>	2,24
<b>18</b>	9,45	52	5,34	<b>86</b>	2,12
<b>19</b>	9,26	53	5,26	<b>87</b>	1,99
<b>20</b>	9,09	54	5,18	<b>88</b>	1,86
<b>21</b>	8,9	55	5,1	<b>89</b>	1,73
<b>22</b>	8,73	56	5,02	<b>90</b>	1,59
<b>23</b>	8,58	57	4,93	<b>91</b>	1,45
<b>24</b>	8,42	58	4,85	<b>92</b>	1,31
<b>25</b>	8,26	59	4,77	<b>93</b>	1,16
<b>26</b>	8,06	60	4,69	<b>94</b>	1,01
<b>27</b>	7,91	61	4,6	<b>95</b>	0,86
<b>28</b>	7,77	62	4,52	<b>96</b>	0,69
<b>29</b>	7,63	63	4,43	<b>97</b>	0,52
<b>30</b>	7,49	64	4,34	<b>98</b>	0,36
<b>31</b>	7,37	65	4,26	<b>99</b>	0,18

## Modélisation de l'évolution des différents composants dans les milieux suivants placés à 20 ou à 50 °C (pendant 2 heures)

Les différents milieux étudiés avec les différentes espèces présentes sont les suivants :

PPO

AA

EPI + PPO

CG + PPO

EPI + AA + PPO

CG + AA + PPO

EPI + CG + PPO

EPI + CG + AA + PPO

Les réactions mises en jeu sont les suivantes :

- Oxydation de l'AA (sans intervention des quinones)
  - 1  $AA + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow DHA + H_2O$  Constantes associées :  $k_{1\ 20}$  et  $k_{1\ 50}$
  - 2  $AA + O_2 \rightarrow DHA + H_2O_2$  Constantes associées :  $k_{2\ 20}$  et  $k_{2\ 50}$
- Oxydation enzymatique des phénols
  - 3  $CG + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow QCG + H_2O$  Constantes associées :  $k_{3\ 20}$  et  $k_{3\ 50}$
  - 4  $EPI + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow QEPI + H_2O$  Constantes associées :  $k_{4\ 20}$  et  $k_{4\ 50}$
- Réactions entre o-quinones et phénols
  - 5  $QCG + EPI \rightarrow CG + QEPI$  Constantes associées :  $k_{5\ 20}$  et  $k_{5\ 50}$
  - 6  $QCG + EPI \rightarrow PCOND$  Constantes associées :  $k_{6\ 20}$  et  $k_{6\ 50}$
  - 7  $QEPI + EPI \rightarrow DIEPI$  Constantes associées :  $k_{7\ 20}$  et  $k_{7\ 50}$
- Réactions entre o-quinones et AA
  - 8  $QCG + AA \rightarrow CG + DHA$  Constantes associées :  $k_{8\ 20}$  et  $k_{8\ 50}$
  - 9  $QEPI + AA \rightarrow EPI + DHA$  Constantes associées :  $k_{9\ 20}$  et  $k_{9\ 50}$

- Dénaturation de la PPO  
10 PPO → PPOdén

Constantes associées :  $k_{10\ 20}$  et  $k_{10\ 50}$

Etablissement des constantes :

\* **Réaction 1** : Les valeurs des constantes cinétiques apparentes ont été déterminées à partir des données expérimentales (figure 28) à 20 et à 50 °C. Nous avons considéré que ces valeurs ont été obtenues à concentration en oxygène constante soit 284  $\mu\text{M}$  à 20 °C et 172  $\mu\text{M}$  à 50 °C (selon la table de Winkler). Connaissant les valeurs des constantes cinétiques apparentes  $k_{app}$ , la concentration en  $\text{O}_2$  (constante) et la stoechiométrie de la réaction, il est possible de calculer les constantes cinétiques réelles de la réaction 1 à ces deux températures à partir de la relation :

$$k_1 \text{ (réelle)} = k_{app} / ([\text{O}_2]^{1/2})$$

$[\text{O}_2]$  est exprimée en mM comme l'ensemble des autres concentrations.

Puisque  $k_{app\ 20} = 10^{-5}$  et  $k_{app\ 50} = 5 \cdot 10^{-5}$ , cela donne :

$k_{1\ 20} = 1.88 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  à 20 °C et  $k_{1\ 50} = 1.21 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  à 50 °C.

#### *Effet température*

A partir des deux valeurs des constantes cinétiques à 20 et à 50 °C, on peut calculer l'énergie d'activation de la réaction 1 entre ces deux températures, elle est égale à 48,9  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

\* **Réaction 2** : Nos résultats ne permettent pas de distinguer la réaction 1 de la réaction 2 (il aurait fallu doser l'apparition de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nous avons considéré que seule la réaction 1 intervenait. Le fait de considérer seulement la réaction 1 ou seulement la réaction 2 ou les deux réactions est sans effet sur la simulation. En effet dès que la PPO est présente (avec ses substrats phénoliques), les vitesses des réactions 1 (et 2) sont négligeables devant celles des réactions 8 et 9.

#### \* **Réactions 3 et 4** :

La PPO agit selon un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel l'oxygène se fixe en premier pour donner un complexe  $\text{E}\cdot\text{O}_2$  qui ensuite fixe le phénol pour libérer une quinone (et de l'eau) et redonner l'enzyme libre.

Avec un phénol, l'équation régissant la vitesse de la réaction en fonction des concentrations en  $\text{O}_2$  ( $[\text{O}_2]$ ) et en phénol ( $[\text{P}]$ ) est la suivante (Segel page 321) :

$$v = (V_m * [P] / K_{mP}) / (1 + K_{mO_2} / [O_2] + [P] / K_{mP})$$

Avec  $V_m$  = vitesse maximale (valeur théorique obtenue aux concentrations saturantes en  $O_2$  et en phénol)

$K_{mP}$  = Constante d'équilibre enzyme – phénol (valeur théorique obtenue pour une concentration saturante en  $O_2$ )

$K_{mO_2}$  = Constante d'équilibre enzyme –  $O_2$  (valeur théorique obtenue pour une concentration nulle en phénol)

Pour déterminer expérimentalement ces constantes, il faut étudier l'évolution de la vitesse en fonction de  $[P]$  en conservant  $[O_2]$  initiale constante. Cela permet de trouver la valeur de  $K_{mP}$  apparente ( $K_{mPapp}$ ) pour la valeur de  $[O_2]$  testée. La relation qui lie cette valeur apparente aux constantes recherchées est la suivante :

$$K_{mPapp} = K_{mP} * (1 + K_{mO_2} / [O_2])$$

Une deuxième série d'expérimentations doit être réalisée toujours avec en faisant varier  $[P]$  et en conservant  $[O_2]$  initiale constante mais à une valeur différente de la série précédente. Ceci permet de déterminer l'influence de  $[O_2]$  sur la valeur de  $K_{mPapp}$  et donc de calculer les valeurs recherchées  $K_{mP}$  et  $K_{mO_2}$  (à noter que la valeur de  $K_{mO_2}$  ne dépend pas de la nature du phénol contrairement à la valeur de  $K_{mP}$ ).

Avec deux phénols (eg CG et EPI), l'équation régissant la vitesse de la réaction en fonction des concentrations en oxygène et en CG et EPI devient :

$$v = \frac{(V_{mCG} * [CG] / K_{mCG} + V_{mEPI} * [EPI] / K_{mEPI})}{(1 + K_{mO_2} / [O_2] + [CG] / K_{mCG} + [EPI] / K_{mEPI})}$$

Avec  $V_{mCG}$  = vitesse maximale (valeur théorique obtenue aux concentrations saturantes en  $O_2$  et en CG)

$V_{mEPI}$  = vitesse maximale (valeur théorique obtenue aux concentrations saturantes en  $O_2$  et en EPI)

$K_{mCG}$  = Constante d'équilibre enzyme – CG (valeur théorique obtenue pour une concentration saturante en  $O_2$ )

$K_{mEPI}$  = Constante d'équilibre enzyme – EPI (valeur théorique obtenue pour une concentration saturante en  $O_2$ )

Valeurs des constantes d'équilibre utilisées pour la simulation que nous avons considérées indépendantes de la température) :

$$K_{mO_2} = 0,28 \text{ mM}$$

$$K_{mCG} = 4 \text{ mM}$$

$$K_{mEPI} = 4 \text{ mM}$$

Pour faire apparaître les constantes de vitesse de la réaction enzymatique, il faut savoir que les paramètres  $V_m$  correspondent aux produits de la concentration en protéine enzymatique totale [PPO] et de la constante de vitesse  $k$  de la dernière étape (limitante) de la réaction de formation des quinones, soit  $V_{mCG} = [PPO] * k_{CG}$  et  $V_{mEPI} = [PPO] * k_{EPI}$ .

Sur une préparation purifiée de PPO de pomme (variété Red Delicious), nous avons déterminé que la valeur du  $V_m$  vis-à-vis du 4MC à pH 4,5 est égale à 266  $\mu\text{kat}$  pour 1 mg de protéine enzymatique soit 20 nmol d'enzyme (MW = 50 kDa) mis en jeu dans la réaction à 20 °C. En conséquence la valeur de  $k_{4MC}$  est égale 13300  $\text{s}^{-1}$  à pH 4,5 ( $266 * 10^{-6} / 20 * 10^{-9} = 13,3 * 10^3$ ).

Ces données signifient que lorsque l'on mesure une activité PPO égale à 10 nkat avec le 4MC à pH 4,5 dans des conditions saturantes, la quantité de protéine enzymatique correspondante est égale à PPO =  $0,75 * 10^{-12}$  mole  $[(10 * 10^{-9}) / (13,3 * 10^3)]$ .

Sachant qu'à 20 °C, le rapport

$$V_{mCG} (\text{à pH } 3,8) / V_{m4MC} (\text{à pH } 4,5) = 0,41 \text{ et}$$

$V_{mEPI} (\text{à pH } 3,8) / V_{m4MC} (\text{à pH } 4,5) = 0,31$ , cela permet de calculer les valeurs des constantes cinétiques à pH 3,8 et à 20 °C pour CG et pour EPI :

$$k_{CG} (\text{à pH } 3,8) = 5500 \text{ s}^{-1} \text{ et}$$

$$k_{EPI} (\text{à pH } 3,8) = 4100 \text{ s}^{-1}$$

#### *Effet température*

les valeurs des constantes cinétiques à pH 3,8 et à 50 °C pour CG et pour EPI :

$$k_{CG} (\text{à pH } 3,8) = 22000 \text{ s}^{-1} (E_a = 36,4 \text{ kJ.mol}^{-1}) \text{ et}$$

$$k_{EPI} (\text{à pH } 3,8) = 11100 \text{ s}^{-1} (E_a = 25,9 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

\* **Réactions 5, 6 et 7** : Aucune donnée dans la littérature pour les réactions entre *o*-quinones et phénols. On sait que les *o*-quinones d'EPI sont nettement plus instables que celles de CG. Ceci explique que l'on ait pris des valeurs de constantes cinétiques plus élevées pour QEPI agissant sur EPI (réaction 7) par rapport à QCG agissant sur EPI (réaction 5). Par ailleurs, nous avons estimé que la constante de vitesse de la réaction 6 (QCG sur EPI) était égale à celle de la réaction 7 ce qui signifie que les réactivités d'EPI vis-à-vis de QCG et vis-à-vis de QEPI sont considérées comme identiques.

#### *Effet température*

Par ailleurs, nous avons estimé pour ces 3 réactions qu'une augmentation de température de 30 °C (entre 20 et 50 °C) provoquait une multiplication par 10 de la constante de vitesse (soit un  $Q_{10}$  proche de 2 ou un  $z$  égal à 30 °C)

\* **Réactions 8 et 9** : On sait que l'AA agit très rapidement sur les *o*-quinones. Nous avons choisi de donner une valeur de constante cinétique très élevée et identique pour les deux *o*-quinones.

#### *Effet température*

Par ailleurs, nous avons estimé pour ces 2 réactions qu'une augmentation de température de 30 °C (entre 20 et 50 °C) provoquait une multiplication par 10 de la constante de vitesse (soit un  $Q_{10}$  proche de 2 ou un  $z$  égal à 30 °C) de façon similaire à ce qui a été fait pour les réactions 5, 6 et 7.

\* **Réaction 10** : La constante de vitesse de dénaturation de la PPO est calculée à partir des données expérimentales (figure 16) à 20 et 50 °C. A 20 °C, la dénaturation de la PPO est considérée comme négligeable pendant 120 min.

Récapitulatif des valeurs des constantes cinétiques à 20 et 50 °C (en  $s^{-1}$ ) et de l'énergie d'activation ( $kJ.mol^{-1}$ ) utilisées pour les 10 réactions :

	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$k_5$	$k_6$	$k_7$	$k_8$	$k_9$	$k_{10}$
20 °C	$1,88 \cdot 10^{-5}$	-	5500	4100	0,1	1	1	10	10	-
50 °C	$1,21 \cdot 10^{-4}$	-	22000	11000	1	10	10	100	100	$2 \cdot 10^{-4}$
Ea	48,9	-	36,4	25,9	60,4	60,4	60,4	60,4	60,4	190

## **Impact de la présence de constituants endogènes de la pomme et de l'acide ascorbique sur la stabilité de la polyphénoloxydase de pomme au cours de traitements thermiques. Étude en milieux modèles.**

**Résumé :** Dans un premier temps nous avons établi les cinétiques de thermo-dénaturation d'un extrait brut de polyphénoloxydase de pomme (Marie-Ménard) dans un milieu malate 20 mM à pH 3,8 et déterminé son énergie d'activation de dénaturation  $E_a$  (190 kJ. mol<sup>-1</sup>) pour des températures entre 50 et 70 °C. Des expérimentations ont permis d'observer l'inhibition de la polyphénoloxydase (PPO) par les produits d'oxydation de phénols simples (acide chlorogénique, (-) épicatechine) et par les procyanidines B<sub>2</sub>. L'acide ascorbique ajouté aux milieux modèles conduit à la formation de divers composés par voie oxydative et thermique dont l'acide déhydroascorbique (DHA) qui augmente la thermosensibilité de la PPO. Une incubation de la PPO pendant 2 h à 50 °C dans une suspension de parois cellulaires (1 g.L<sup>-1</sup>) a montré une perte accrue de l'activité PPO, traduisant une possible adsorption de l'enzyme. Des essais en milieu purée diluée contenant tous les constituants endogènes de la pomme, l'acide ascorbique et leurs produits de dégradation ont permis d'avoir une première évolution de l'activité PPO dans ce milieu complexe au cours du chauffage à 50 °C.

**Mots clés :** Brunissement enzymatique, thermo-dénaturation, purée de pomme, acide ascorbique polyphénoloxydase, parois cellulaires.

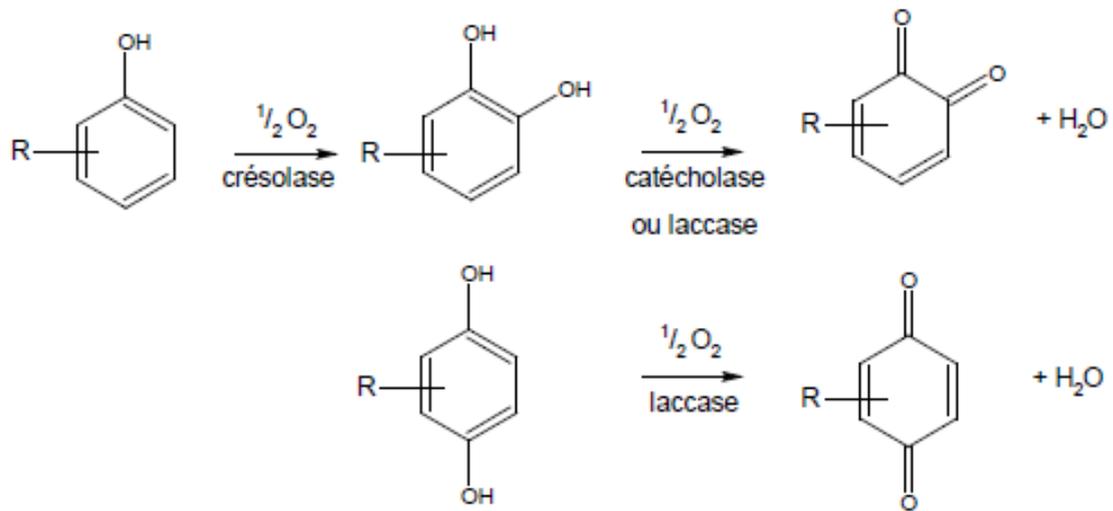
---

## **Impact of the presence of endogenous components of apple and ascorbic acid on the stability of apple polyphenoloxidase during heat treatments. Study in model systems.**

**Abstract:** Firstly we established the kinetics of thermal inactivation of a crude extract of apple polyphenoloxidase (Marie-Menard) in buffer solution of malate 20 mM at pH 3.8 and determined its activation energy of alteration  $E_a$  (190 kJ. mol<sup>-1</sup>) for temperatures between 50 and 70 °C. Results of experiments pointed out the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) by the oxidation products of some free phenols (chlorogenic acid, (-) epicatechin) and procyanidins B<sub>2</sub>. Ascorbic acid added to the model systems leads to the formation of various compounds by oxidation and thermal degradation among which dehydroascorbic acid (DHA), seems to increase the thermo denaturation of PPO. Incubation of PPO for 2 h at 50 °C in a suspension of cell walls (1 g.L<sup>-1</sup>) resulted in an increased loss of PPO activity, indicating a possible adsorption of the enzyme. Model systems of diluted applesauce model containing the endogenous apple's components, ascorbic acid and their degradation products allow to obtain a first evolution of PPO activity in this complex environment during heating at 50 °C.

**Keywords:** enzymatic browning, heat degradation, applesauce, ascorbic acid, polyphenol oxidase, cell wall.

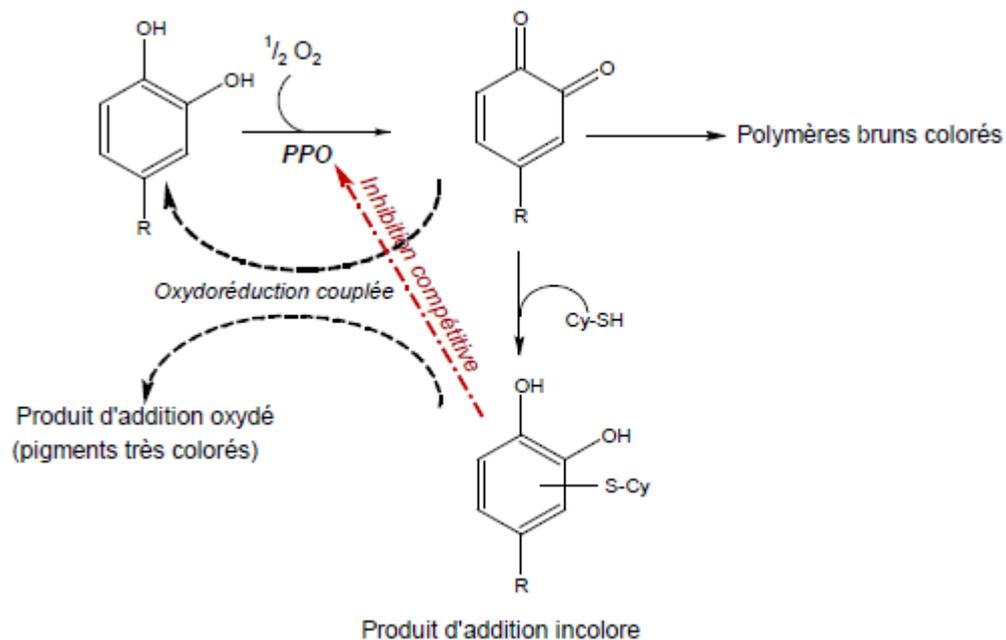
# **FIGURES**



**Figure.1 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases**

**Tableau I : Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de Mc Evily *et al.*, 1992)**

Agents réducteurs	sulfites et dérivés acide ascorbique et analogues cystéine et glutathion
Agents chélateurs	phosphates EDTA acides organiques
Acidifiants	acide citrique acide phosphorique
Inhibiteurs d'enzyme	acides carboxyliques aromatiques alcools aliphatiques anions peptides résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	oxygénases o-méthyltransférase protéases
Agents complexants	cyclodextrines



**Figure.2 : Effets de la cystéine (Cy-SH) sur l'oxydation enzymatique d'o-diphénols catalysée par la PPO (d'après Richard-Forget, 1992)**

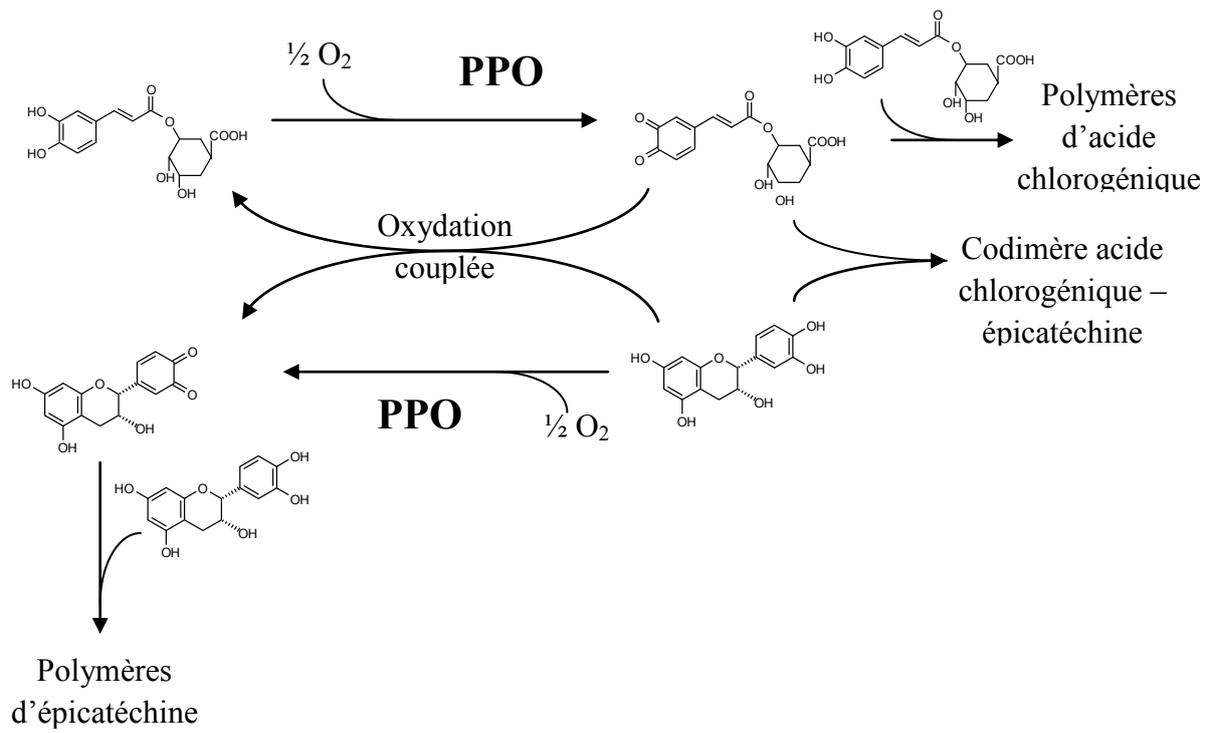
**Tableau II : Teneur en constituants de diverses variétés de (jus) pommes (adapté de Wu et al., 2006)**

Variété	Constituants			
	Maturité	Teneur en Sucres Solubles (%)	Teneur en Sucre totaux (g.L <sup>-1</sup> )	pH
Red Delicious	Juillet	10,48 ± 0,46	83,7 ± 0,8	2,8 ± 0,1
Golden Delicious	Août	13,40 ± 1,55	113,8 ± 1,4	3,8 ± 0,1
Fuji	Septembre	13,84 ± 1,21	125,0 ± 1,7	3,2 ± 0,1
Granny Smith	Octobre	12,03 ± 0,75	97,0 ± 1,2	3,4 ± 0,1

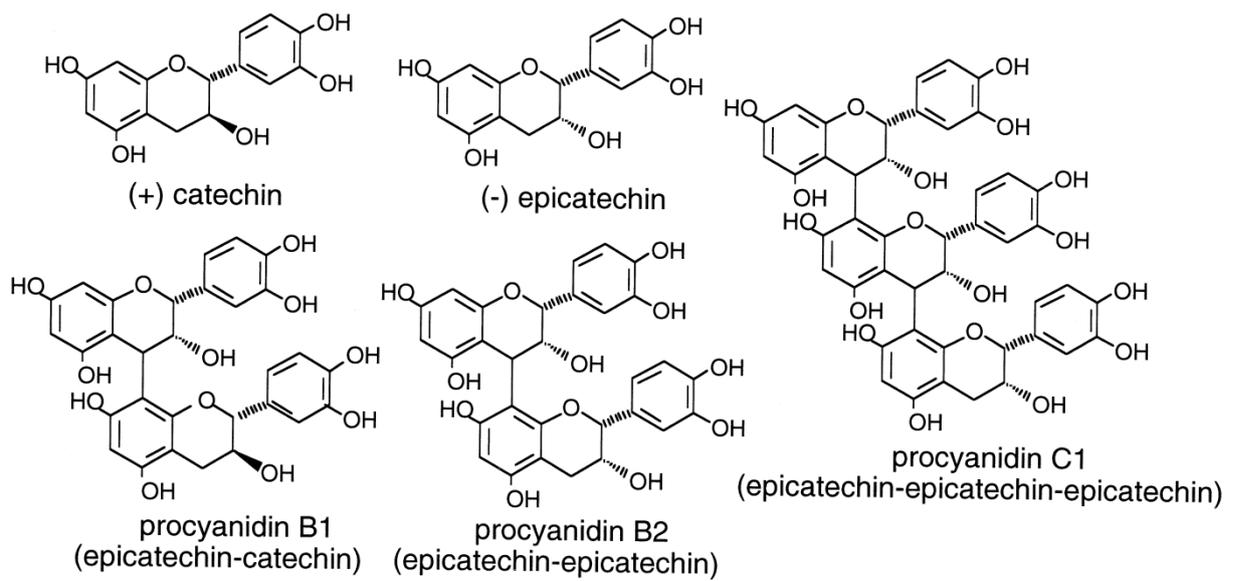
Variété	Glucides (g.L <sup>-1</sup> )		
	Fructose	Glucose	Saccharose
Red Delicious	44,2 ± 0,7	24,7 ± 0,4	18,3 ± 0,7
Golden Delicious	58,5 ± 0,6	29,5 ± 0,3	25,1 ± 0,6
Fuji	64,5 ± 0,6	38,4 ± 0,3	23,3 ± 0,6
Granny Smith	42,6 ± 0,6	26,6 ± 0,4	20,9 ± 0,7

Variété	Acide organique (mg.L <sup>-1</sup> )			
	Quinique	Malique	Citrique	Succinique
Red Delicious	0,546 ± 0,055	2,73 ± 0,93	0,053 ± 0,023	0,150 ± 0,044
Golden Delicious	0,036 ± 0,036	4,45 ± 0,75	0,013 ± 0,003	0,063 ± 0,039
Fuji	0,171 ± 0,036	3,91 ± 0,74	0,044 ± 0,017	0,061 ± 0,038
Granny Smith	0,218 ± 0,044	7,07 ± 0,82	0,063 ± 0,020	0,059 ± 0,041

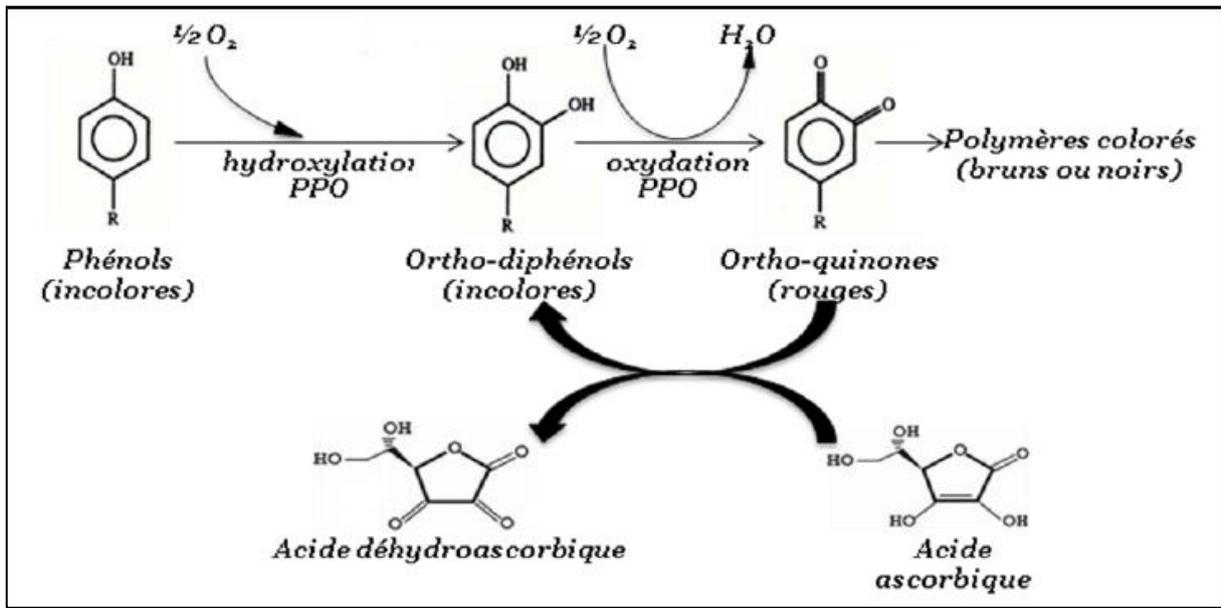
Variété	Phénols (mg.L <sup>-1</sup> )						
	CG	EPI	Acide coumarique	Phloridzine	Catéchine	Acide caféique	Total
Red Delicious	1,97 ± 0,76	14,1 ± 2,1	4,05 ± 0,25	2,49 ± 0,12	3,06 ± 0,14	0,51 ± 0,10	26,2
Golden Delicious	23,2 ± 7,8	21,2 ± 2,0	3,04 ± 0,20	4,13 ± 0,84	3,86 ± 0,12	2,43 ± 0,16	57,9
Fuji	16,2 ± 7,7	29,9 ± 2,0	3,19 ± 0,19	4,12 ± 0,83	3,15 ± 0,12	2,23 ± 0,52	58,7
Granny Smith	6,88 ± 0,85	40,4 ± 2,1	9,33 ± 0,23	1,63 ± 0,10	2,02 ± 0,13	2,42 ± 0,65	62,7



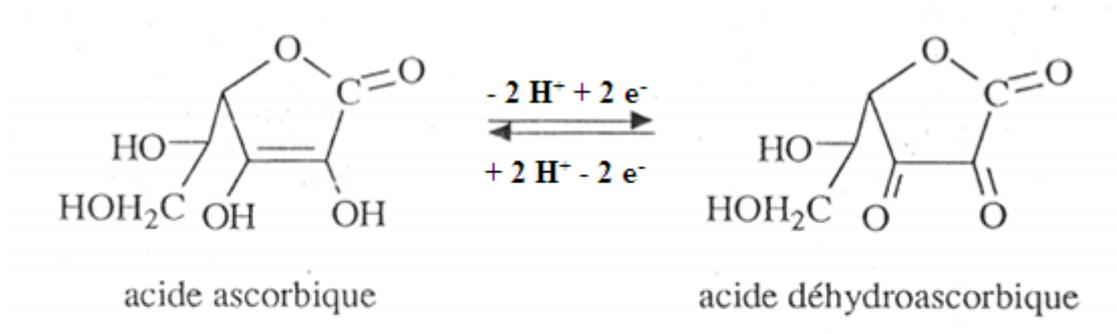
**Figure.4 : Mécanismes réactionnels montrant l'oxydation enzymatique du CG et de l'EPI et l'oxydation couplée non enzymatique de l'EPI**



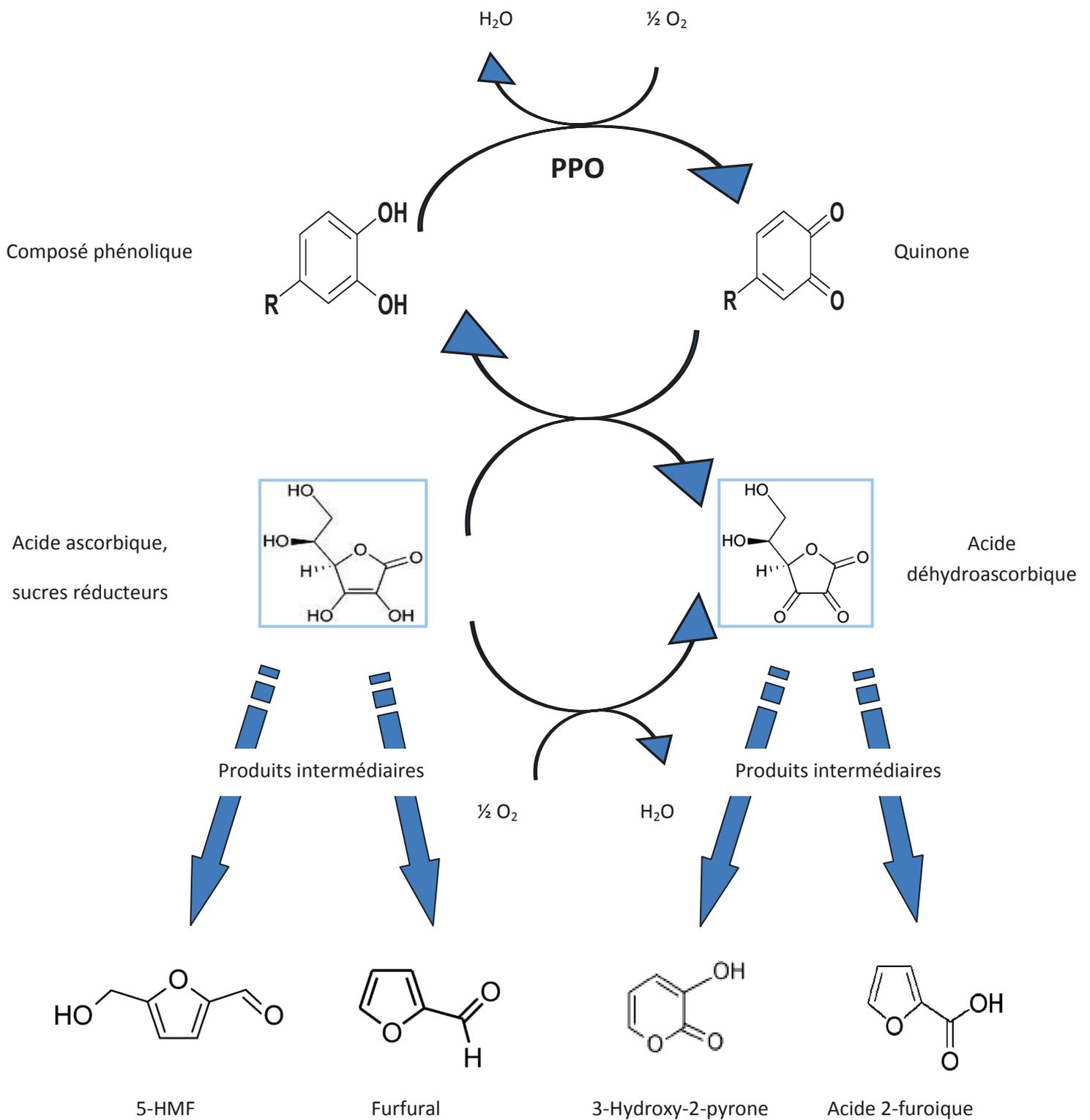
**Figure.5 : Structure de la catéchine, de l'épicatéchine et des procyanidines B1, B2 et C1 (Shibusawa et al., 2000)**



**Figure.6 : Mécanisme d'action de l'acide ascorbique en présence de phénols et de PPO**



**Figure.7 : Equilibre d'oxydoréduction entre l'acide ascorbique (AA) et l'acide déhydroascorbique (DHA)**



**Figure.8 : Mécanismes de dégradation de l'AA en présence d'oxygène**

## Procédé de fabrication de la purée de pomme

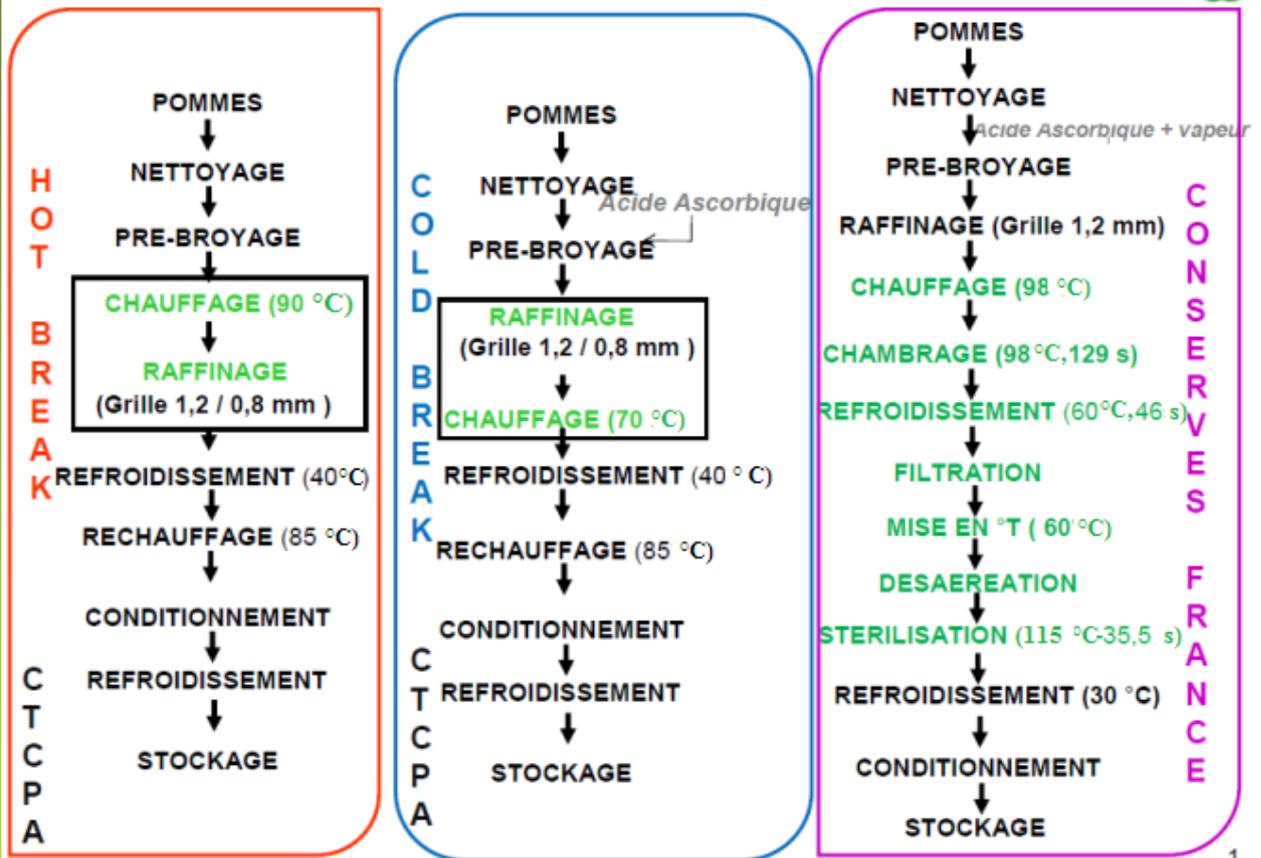


Figure.9 : Différents procédés de fabrication de la purée de pomme

**Tableau III : Quantités d'acide chlorogénique et des produits de dégradation de l'acide ascorbique dans 100 g de compote**

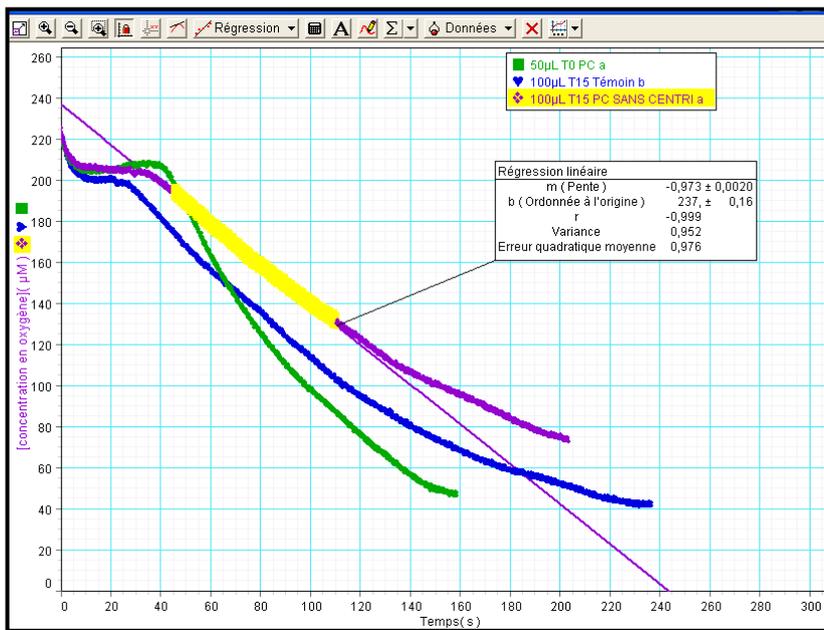
	Acide chlorogénique mg / 100 g	3H2P mg / 100 g	Furfural mg / 100 g	Acide furoïque mg / 100 g	5HMF mg / 100 g
Compote Cold Break	6,76 ± 0,1	2,40 ± 0,03	0,54 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,51 ± 0,01



Sonde à Oxygène et cuve réactionnelle  
(1,5 mL thermostatée)

Tensiomètre

Bain-marie à circulation fermée



Exemple de graphe donnant la concentration en O<sub>2</sub> dissous (µM) en fonction du temps (s)

**Fig.10 : Polarographe automatisé avec sonde à oxygène BERNSTEIN et équipé du logiciel de traitement du signal DATASTUDIO**

Préchauffage des 1400  $\mu$ L  
du milieu modèle (10 min)

A t = 0, ajout de 100  $\mu$ L de PPO (t0)



Traitement thermique

À t15, t30...t120 min



**Pour chaque essai n = 3**

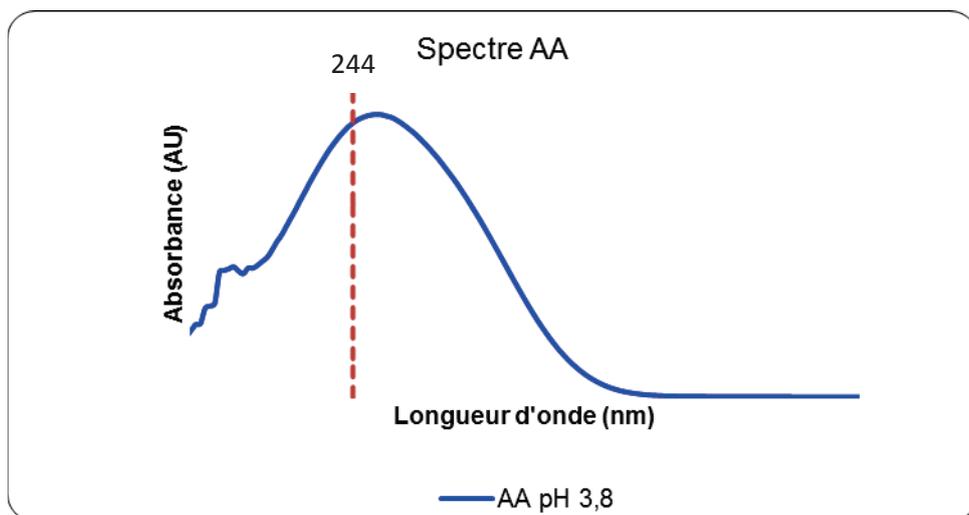
Bain glacé (2 min)

Dosage activité PPO par polarographie  
avec le 4-MC 20 mM à pH 4,5 et à 30 °C

Dosage du phénol résiduel  
par CLHP (milieu arrêté)

Dosage de l'AA résiduel par CLHP  
(milieu arrêté)

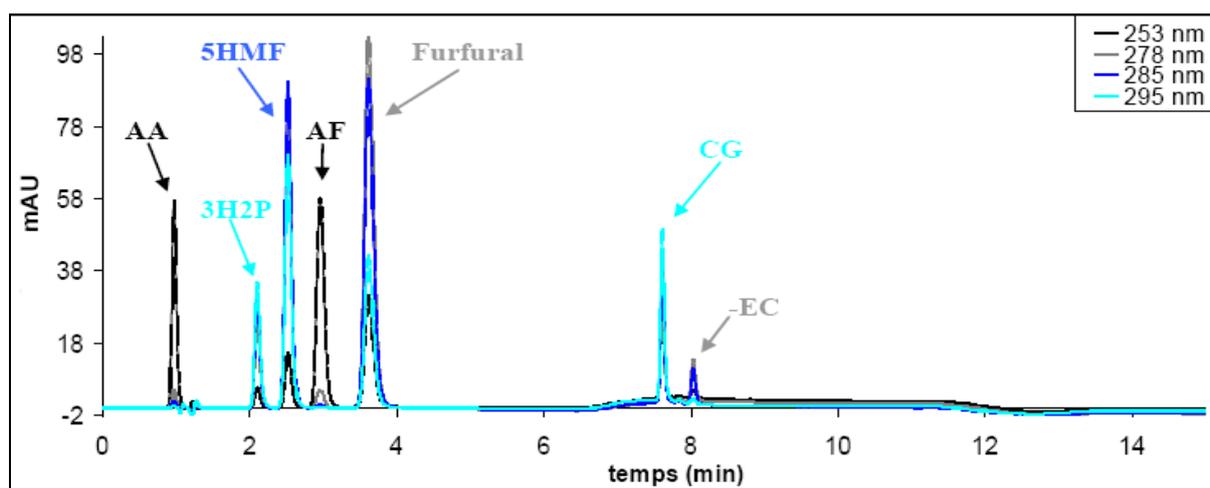
**Fig.11 : Protocole expérimental du traitement thermique des milieux modèles.  
Suivi de l'activité PPO résiduelle et des teneurs résiduelles en phénols  
(CG et EPI) et de l'acide ascorbique (AA)**



**Fig.12 : Exemple de spectre d'absorption de l'AA en solution dans du tampon malate 20 mM à pH 3,8**

**Tableau IV : Longueur d'onde de détection, temps de rétention, limite de détection (LD), limite de quantification (LQ) et coefficient de réponse (CR) de composés standards issus de la dégradation de l'acide ascorbique**

	3H2P	AF	Furfural	5HMF
Longueur d'onde (nm)	295	253	278	285
Temps de rétention (min)	2,1	2,9	3,6	2,5
LD ( $\mu\text{M}$ )	0,04	0,03	0,04	0,02
LQ ( $\mu\text{M}$ )	0,14	0,09	0,12	0,07
CR ( $\text{mAU}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )	154	270	309	364



**Figure.13 : Exemples de chromatogrammes obtenus en CLHP-DAD pour le 3H2P (295 nm), le 5HMF (285 nm), l'AF (253 nm) et le furfural (278 nm). Les composés phénoliques libres (l'acide chlorogénique (CG) et la (-) épicatechine (EC) sont ensuite élués sur le même chromatogramme.**

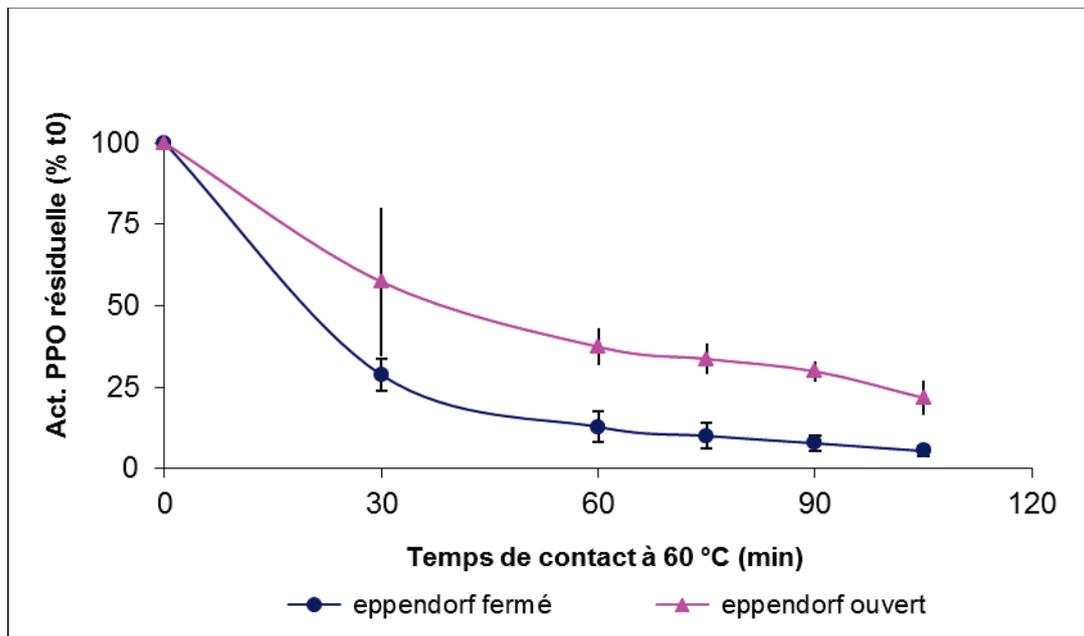
**Tableau V : Mesure de l'activité enzymatique de deux variétés de pomme par polarographie**

Substrat 4-MC 20 mM pH 4,5	Marie-Ménard	Golden Delicious
Activité PPO (nkat/g de pomme mh*)	1620 ± 42	228 ± 4

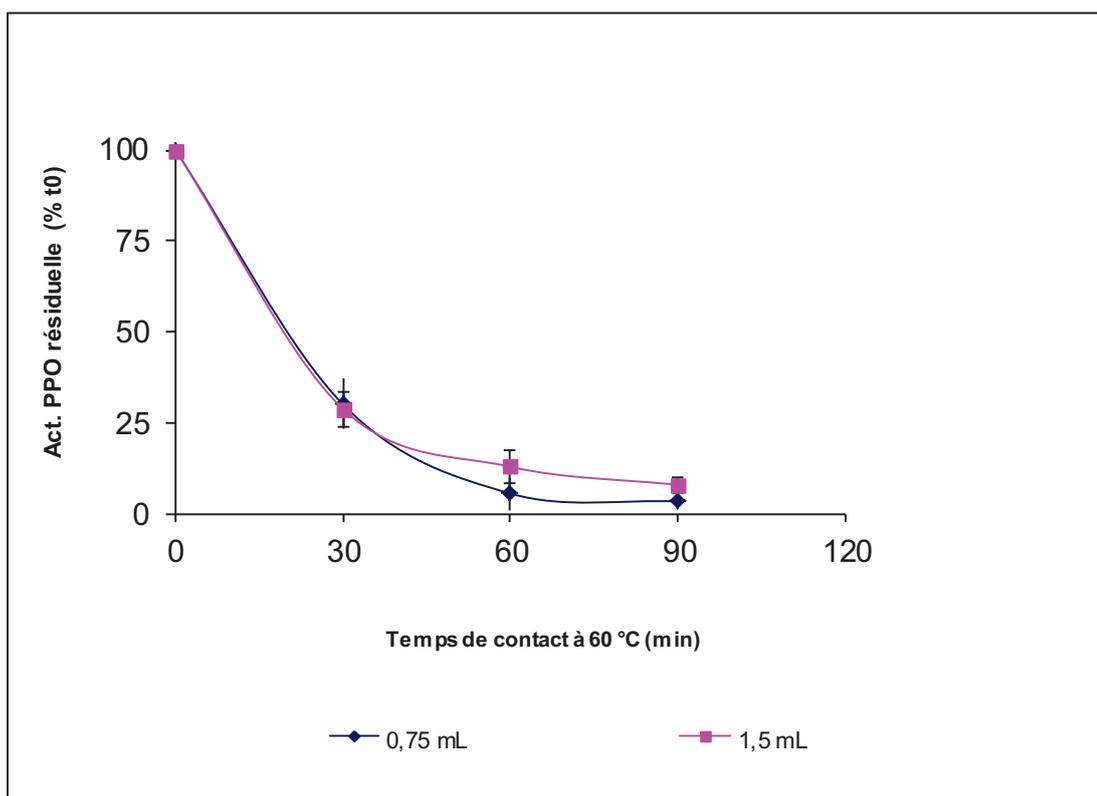
mh\* = matière humide

**Tableau VI : Comparaison des activités PPO des EB de Golden Delicious et de Marie-Ménard avec divers substrats phénoliques à 30 °C et à pH 4,5 (tampon Mc Ilvaine) et pH 3,8 (tampon malate)**

	Paramètres	Golden Delicious pH 4,5	Marie-Ménard pH 4,5	Marie-Ménard pH 3,8
4- Méthylcatéchol	$V_m$ (nkat.mL <sup>-1</sup> )	124	774	464
	$K_m$ (mM)	7,8	7,3	7,2
	$V_m / K_m$	16	106	64
(-)-Epicatechine	$V_m$	60	402	241
	$K_m$	5,7	4,4	4,5
	$V_m / K_m$	10,5	91,6	54
Acide chlorogénique	$V_m$	118	536	322
	$K_m$	6,4	2,8	2,9
	$V_m / K_m$	18,6	193	110



**Fig.14 : Comparaison de l'activité PPO résiduelle mesurée au cours du chauffage à 60 °C pendant 2 h lorsque le tube est fermé ou ouvert**

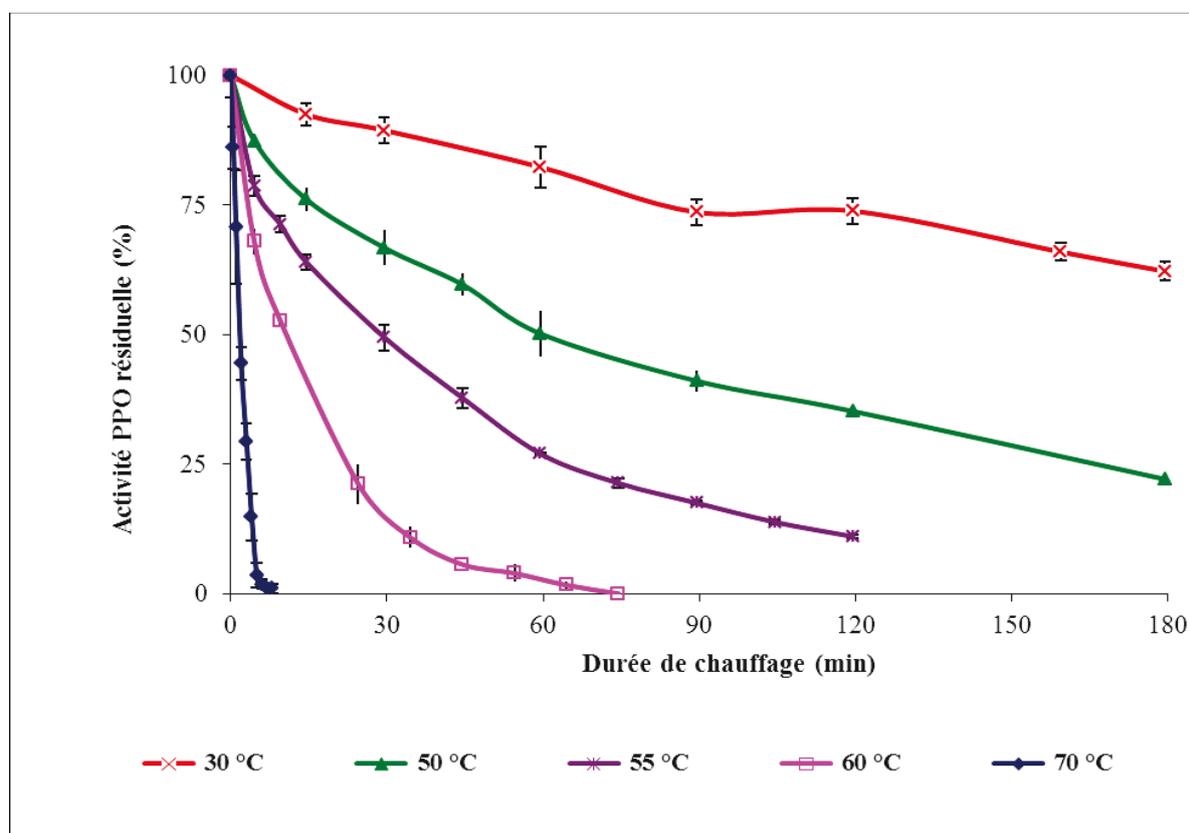


**Fig.15 : Comparaison de l'activité PPO résiduelle mesurée au cours du chauffage à 60 °C pendant 2 h pour des volumes aqueux réactionnels variables (0,75 ou 1,5 mL)**

**Tableau VII : Contenu initial en acide chlorogénique (CG = 0,56 mM), en (-)-épicatéchine (EPI = 0,34 mM), en acide ascorbique (AA = 5,6 mM) et en oxygène dans les tubes Eppendorf fermés à 20 °C avec 0,75 ou 1,5 mL de phase liquide (les calculs sont explicités dans la partie matériel et méthodes)**

Volume (mL)*		Phénols et acide ascorbique (μmol)			Oxygène (μmol)		Ratio
Liquide	Gaz	CG	EPI	AA	Dissous	Gazeux	O <sub>2</sub> / Σphénols
0,7 + 0,05	0,918	0,39	0,24	3,92	0,21	8,01	13
1,4 + 0,1	0,168	0,78	0,48	7,84	0,43	1,46	1,5

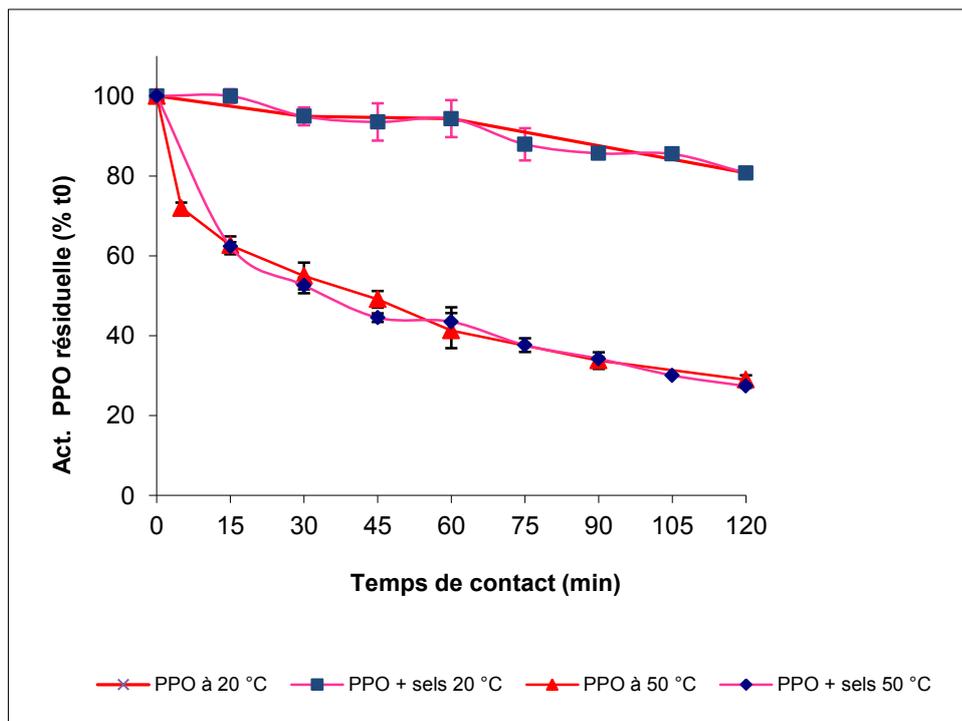
\* Pour le volume de liquide, le premier chiffre représente le volume de tampon malate contenant les phénols et l'acide ascorbique et le second chiffre représente le volume d'extrait enzymatique



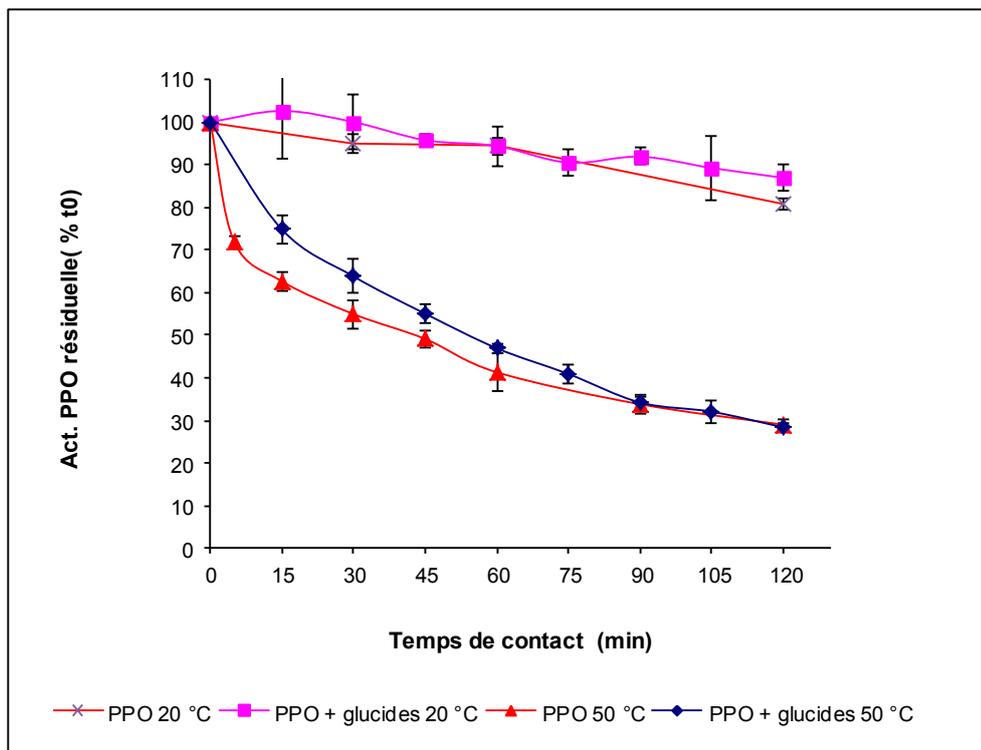
**Fig.16 : Evolution de l'activité PPO en fonction de la température (30-70 °C) et de la durée de chauffage (0 -180 min) dans un milieu de tampon malate 20 mM à pH 3,8**

**Tableau VIII : Paramètres de thermosensibilité de l'extrait brut de PPO de pomme (variété Marie-Ménard) : constantes de vitesse k, D, Energie d'activation, z et Q<sub>10</sub> entre 50 et 70 °C**

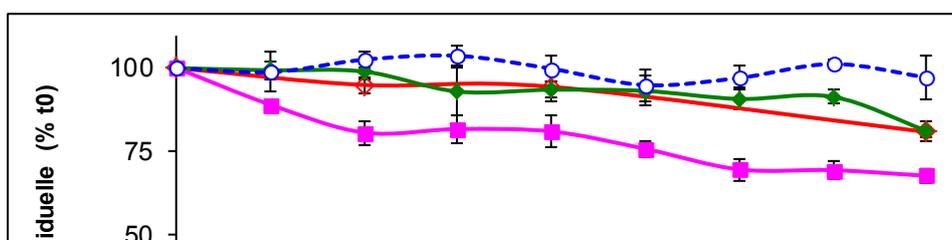
Température	k (min <sup>-1</sup> )	D (min)	Ea (kJ.mole <sup>-1</sup> )	z (°C)	Q <sub>10</sub>
30 °C	0,0025	910			
50 °C	0,0085	271	190 (entre 50 et 70 °C)	11 (entre 50 et 70 °C)	7,8 (entre 50 et 60 °C)
55 °C	0,0177	130			7,6 (entre 60 et 70 °C)
60 °C	0,0617	37			
70 °C	0,470	4,9			



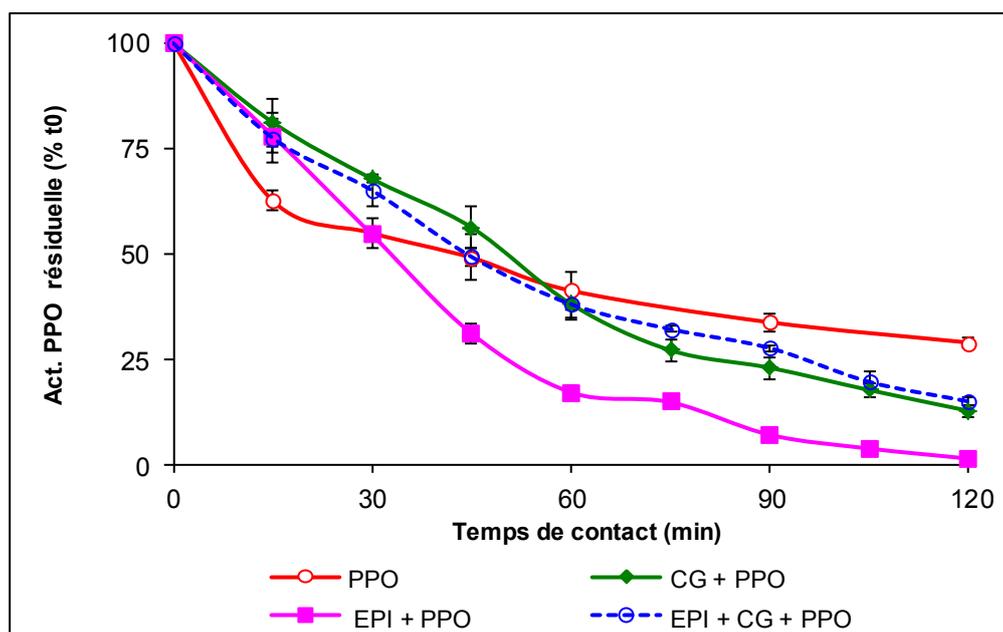
**Fig.19 : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 à 20 et 50 °C en absence ou en présence de sels**



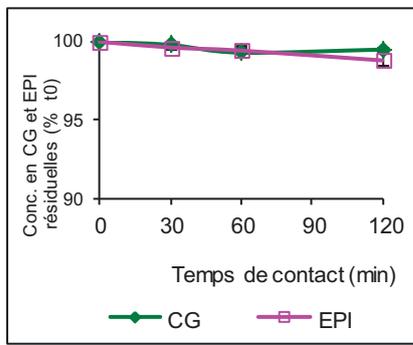
**Fig.20 : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 à 20 et 50 °C en absence ou en présence de glucides**



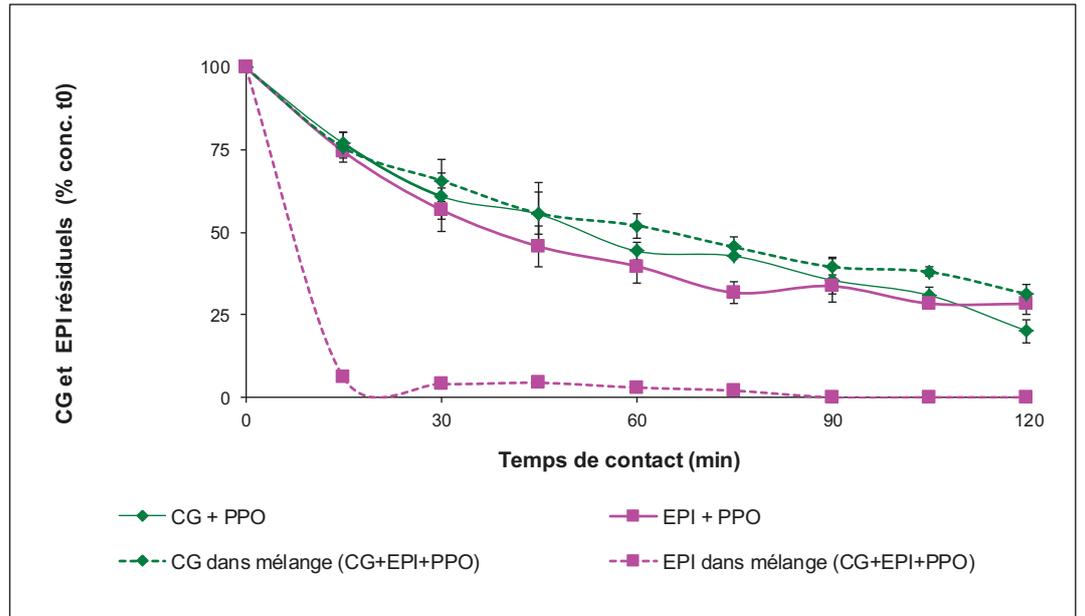
**Fig.21 : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 à 20 °C  
en absence ou en présence de CG (0,56 mM) et / ou d'EPI (0,34 mM)**



**Fig.22 : Evolution de l'activité PPO à pH 3,8 à 50 °C  
en absence ou en présence de CG (0,56 mM) et / ou d'EPI (0,34 mM)**

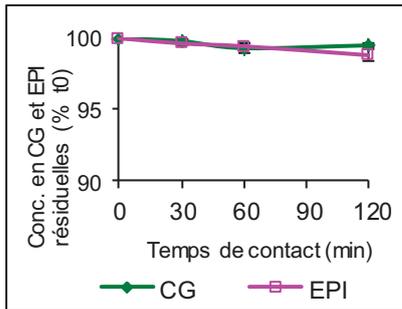


(a)

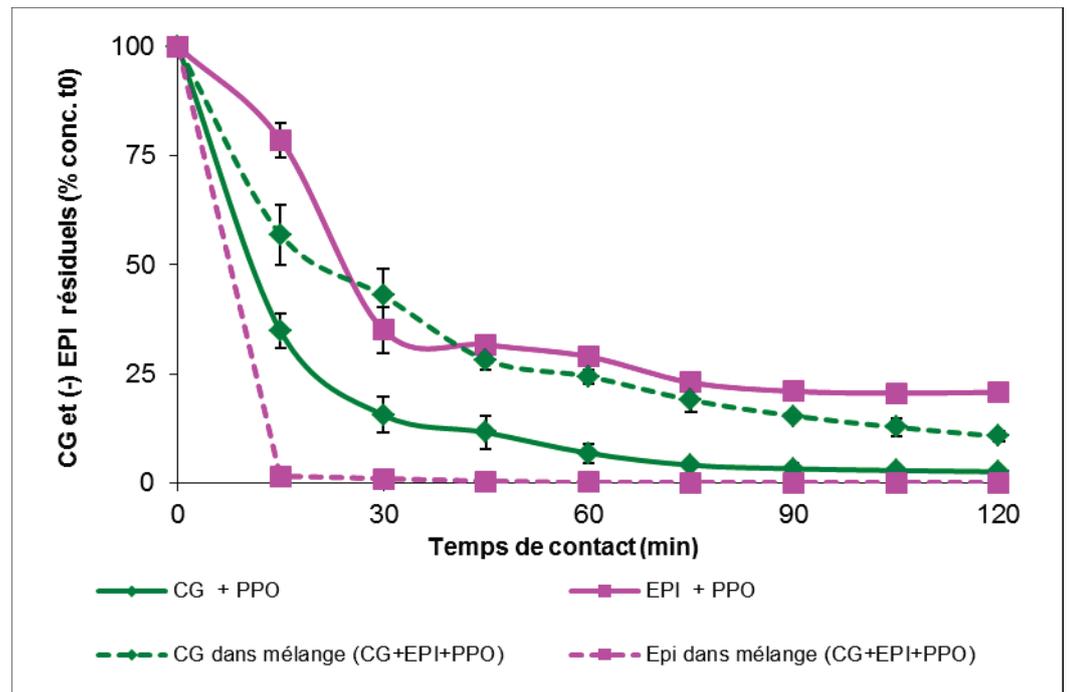


(b)

**Fig.23 : Evolution à 20 °C de la teneur en CG et EPI seuls ou en mélange, en absence (a) ou en présence (b) de PPO**

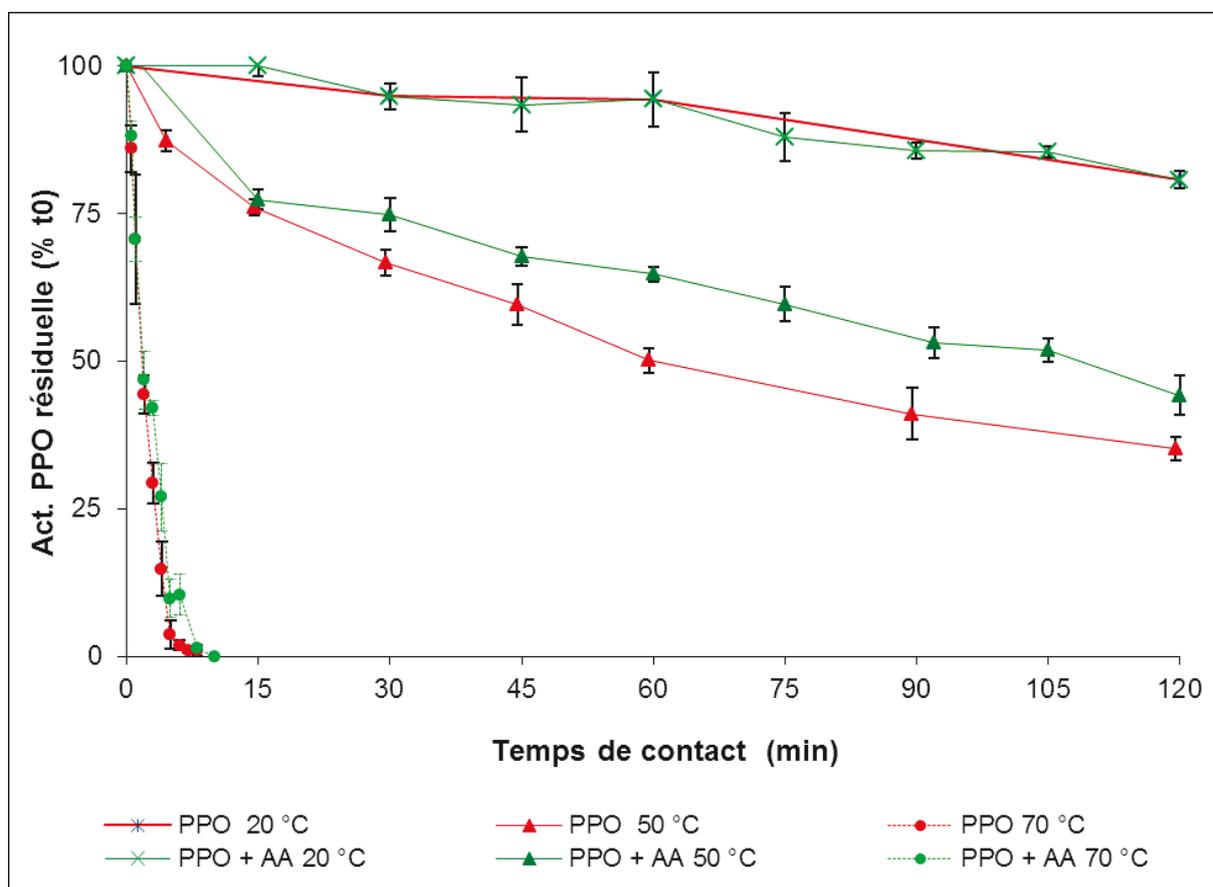


(a)

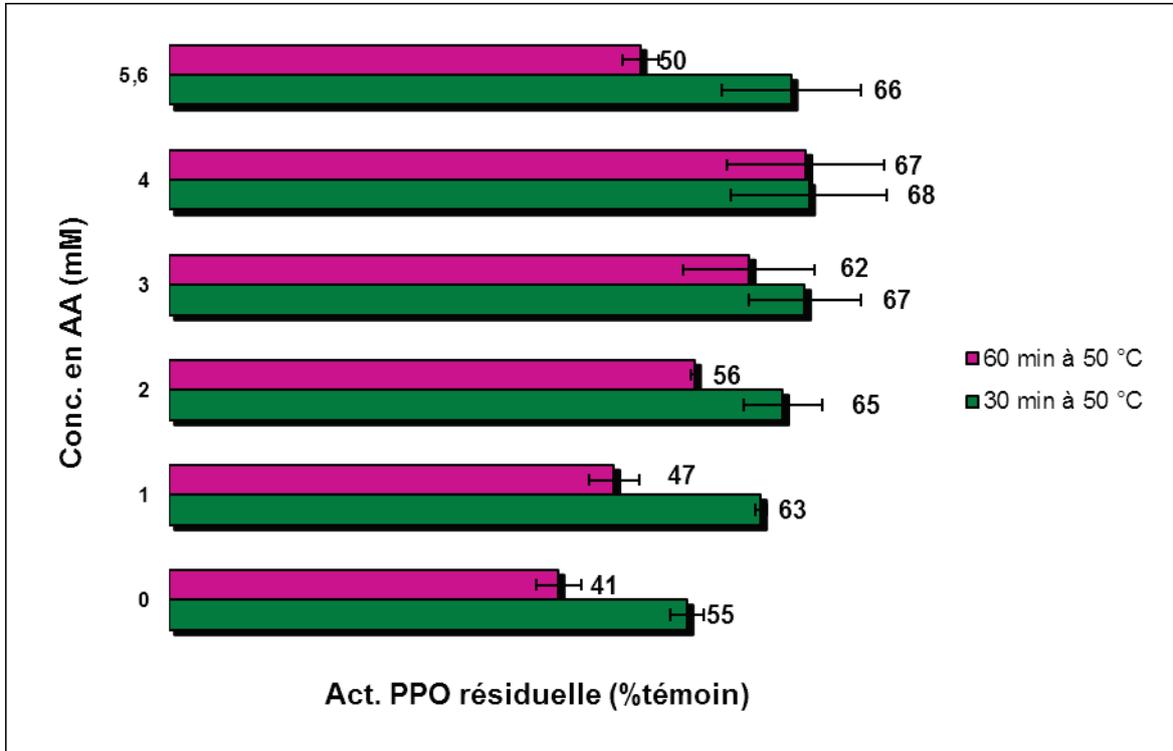


(b)

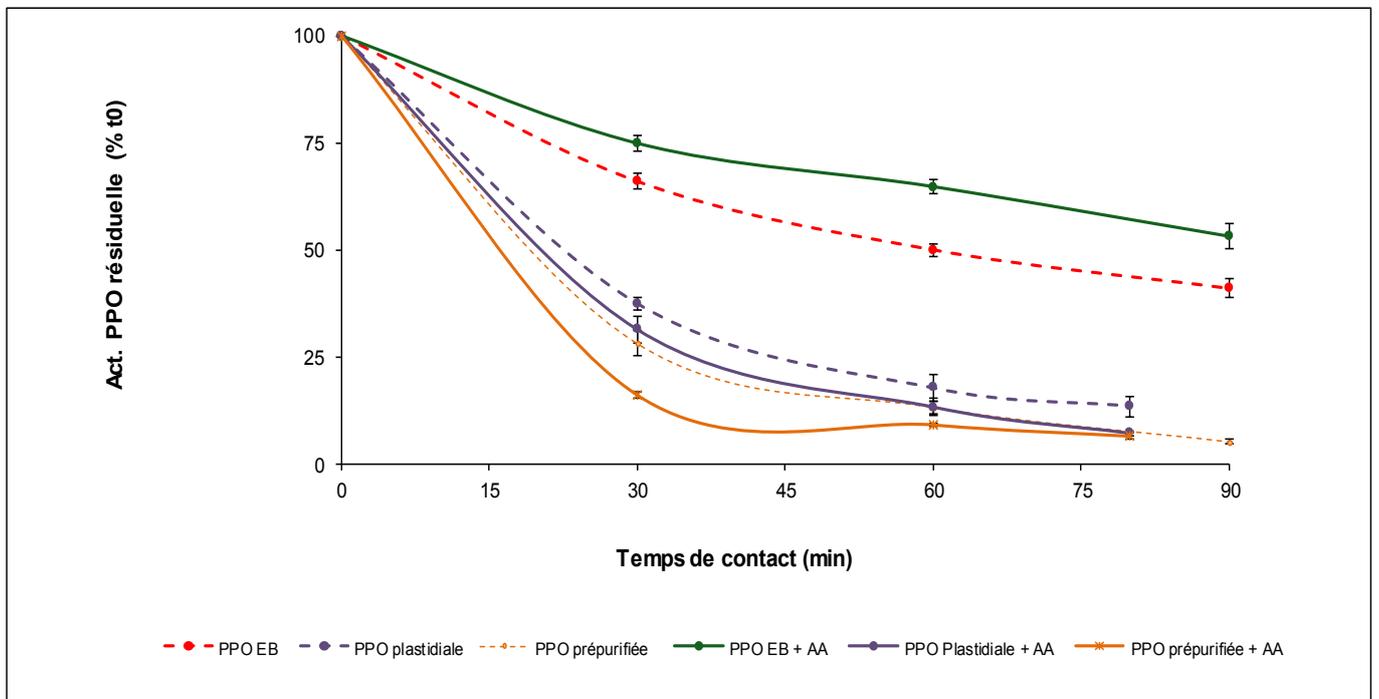
**Fig.24 : Evolution à 50 °C de la teneur en CG et EPI seuls ou en mélange, en absence (a) ou en présence (b) de PPO**



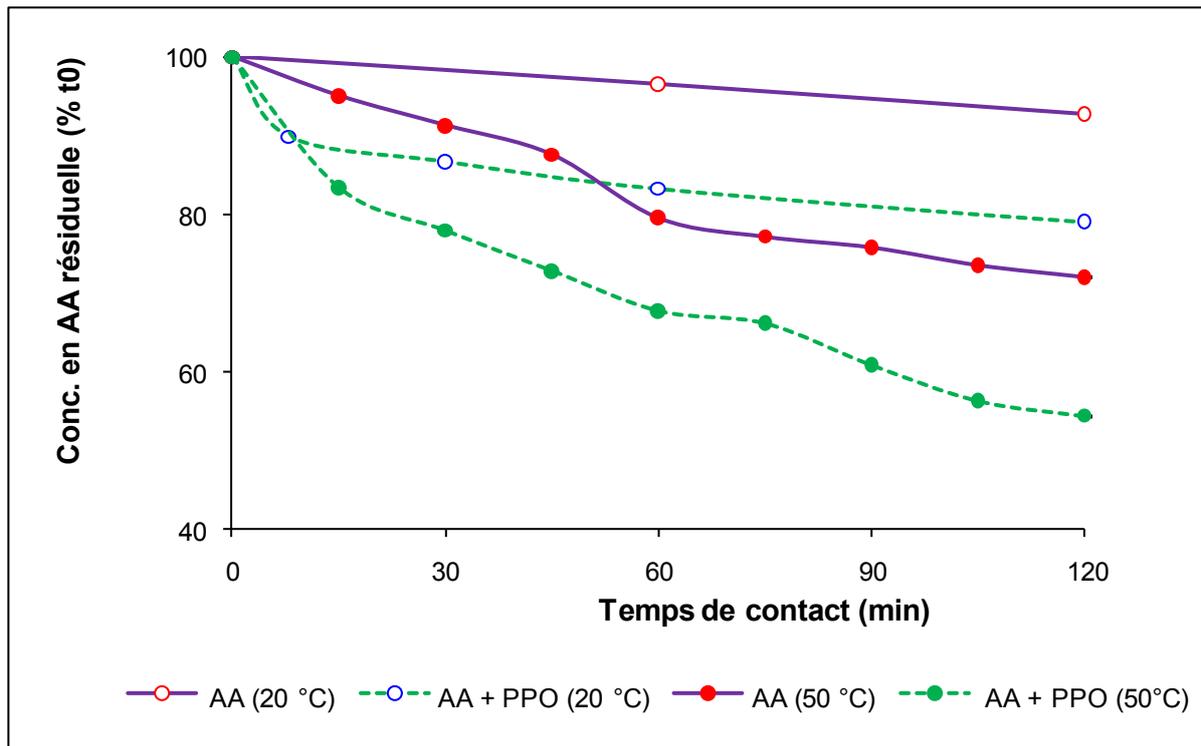
**Fig.26 : Evolution de l'activité PPO à 20, 50 et 70 °C pendant 120 min en absence ou en présence d'AA (5,6 mM)**



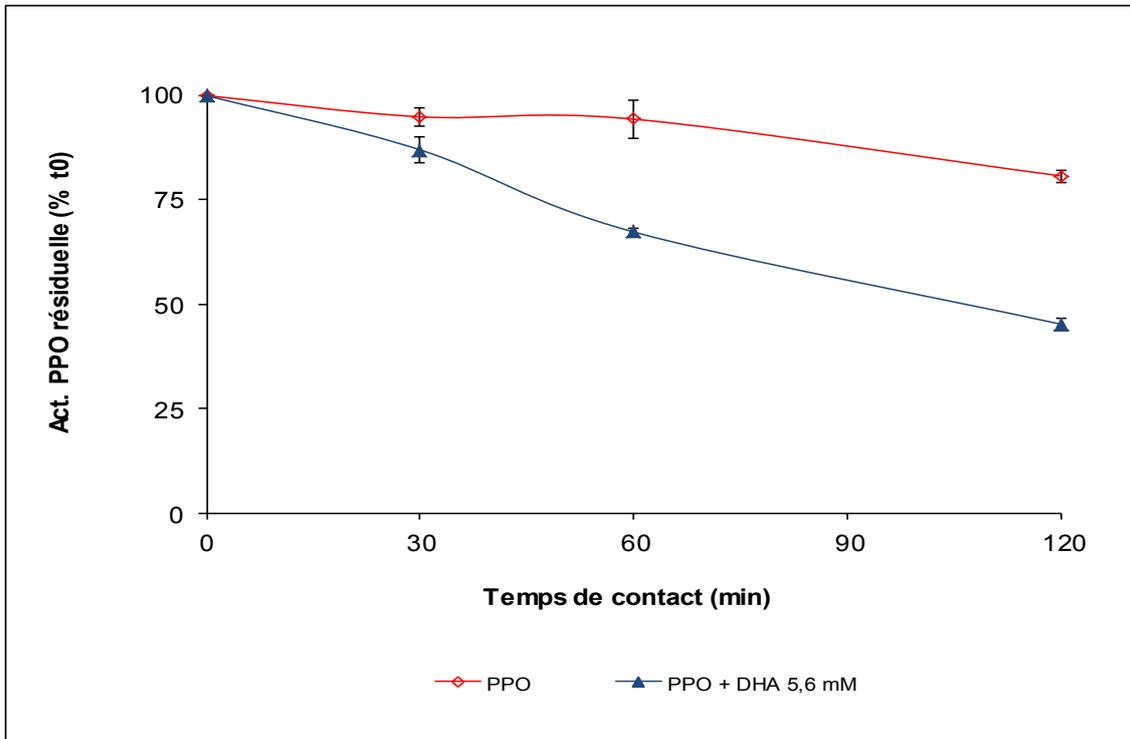
**Fig.27 : Evolution de l'activité PPO à 50 °C pendant 30 et 60 min de contact en présence d'une concentration variable en AA (1 à 5,6 mM)**



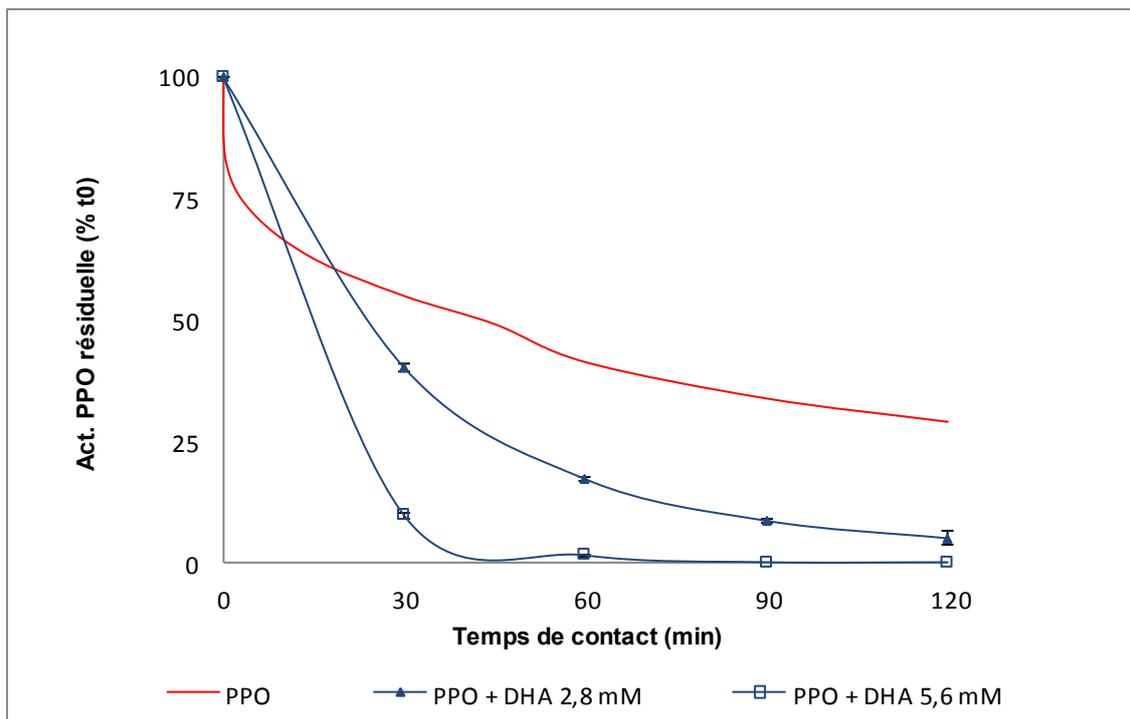
**Fig.28 : Evolution de l'activité PPO à 50 °C de différentes formes d'extraits enzymatiques (extrait brut de PPO plastidiale, de PPO soluble et extrait de PPO pré-purifié) en absence ou en présence d'AA (5,6 mM)**



**Fig.29 : Concentration résiduelle en AA en absence ou en présence de PPO à 20 et 50 °C**

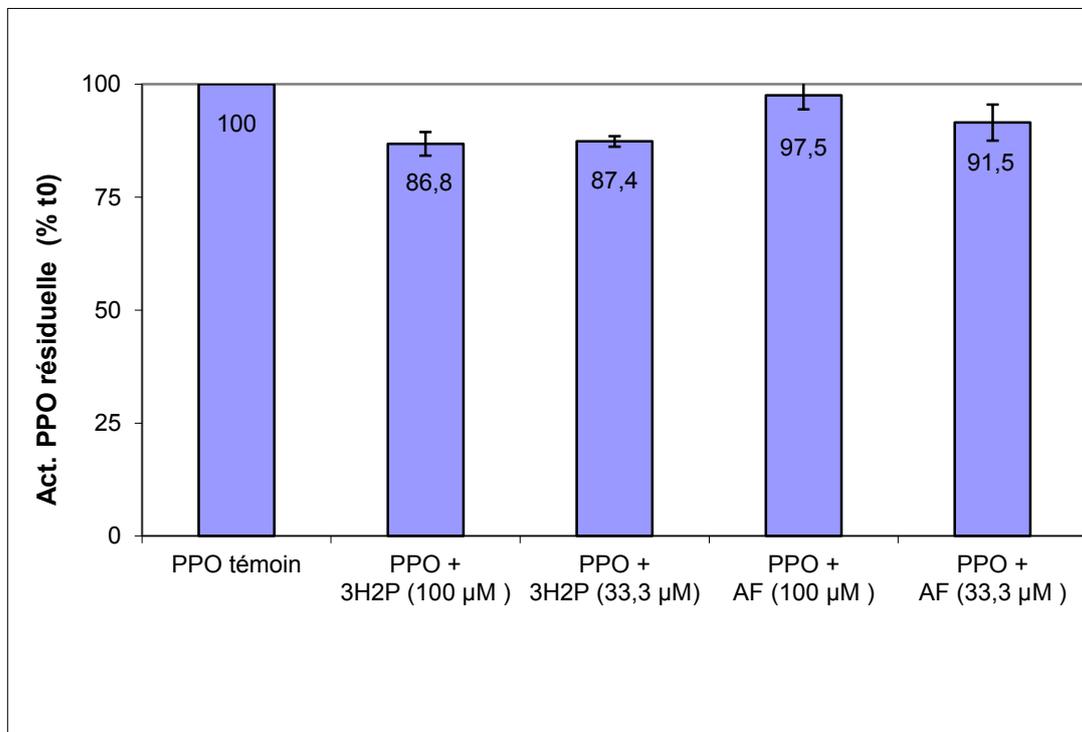


(a)

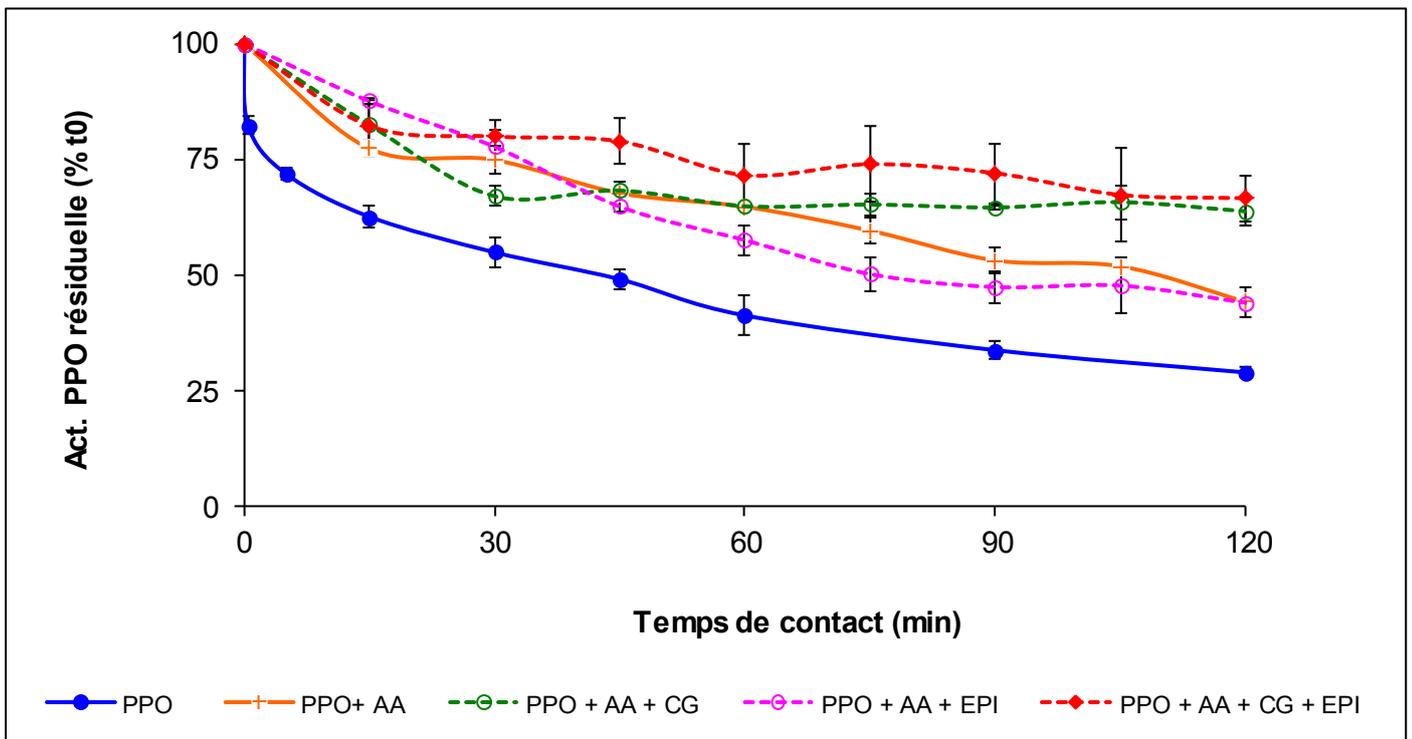


(b)

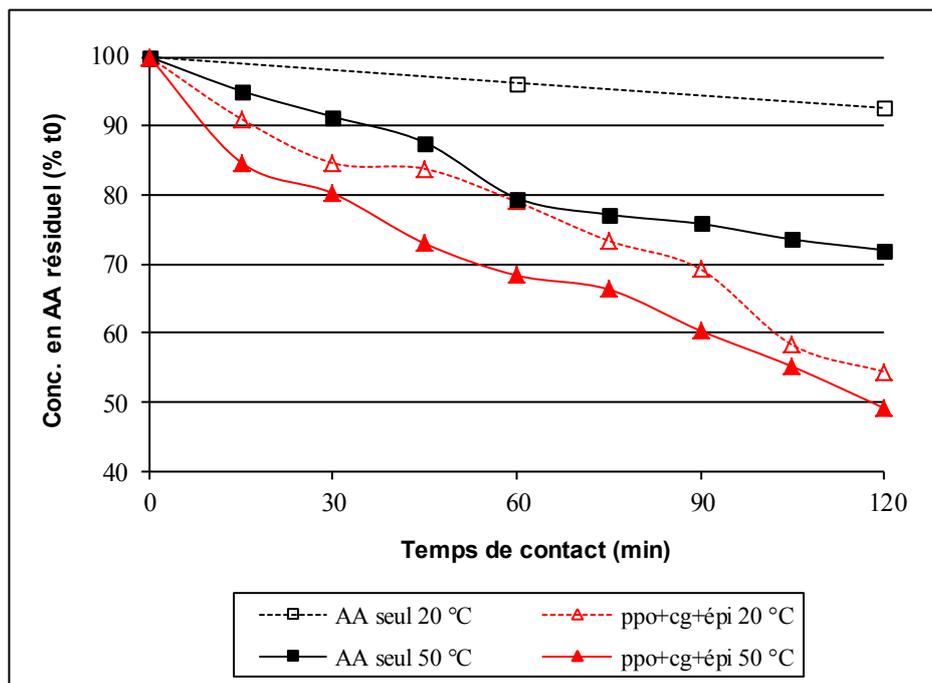
**Fig.30 : Evolution de l'activité PPO résiduelle en absence ou en présence de DHA à 20 °C (a) et à 50 °C (b)**



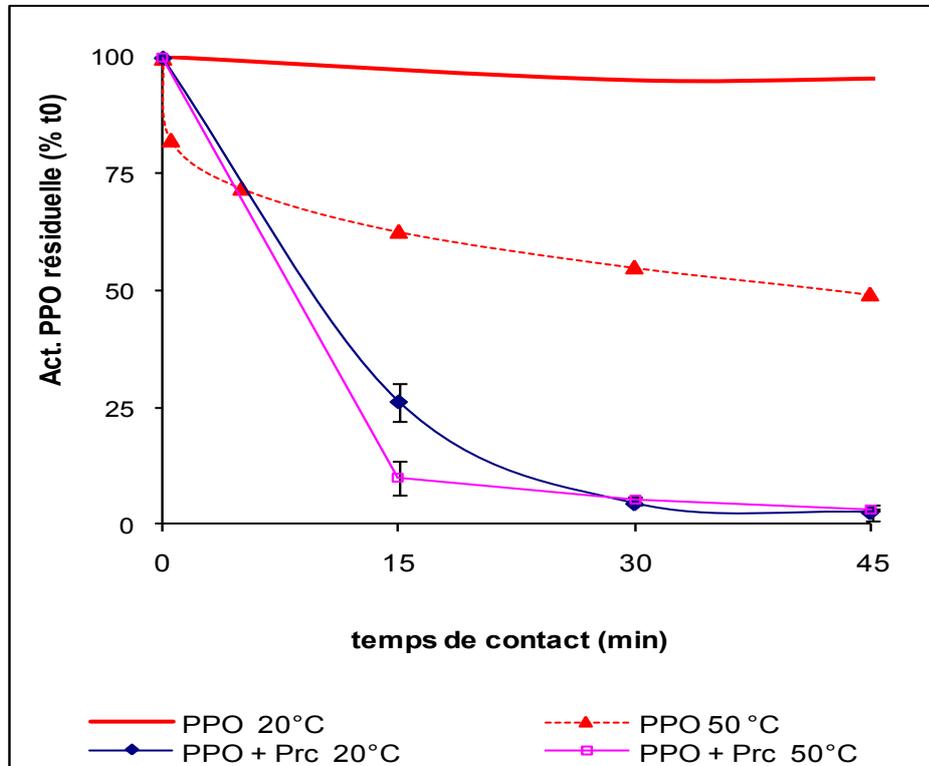
**Fig.31 : Mesure de l'activité PPO en présence de 2 composés issus de la dégradation oxydative de l'AA, 3H2P ou acide furoïque (AF) aux concentrations de 33,3 et 100 µM**



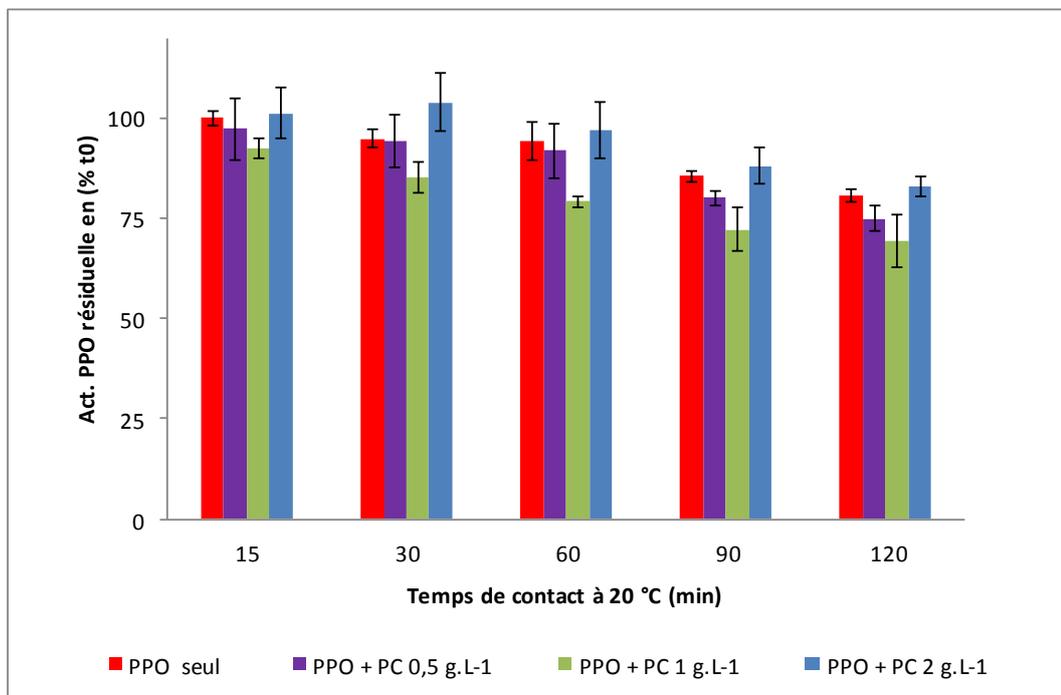
**Fig.32 : Evolution de l'activité PPO résiduelle à 50 °C dans un mélange d'AA (5,6 mM), de CG (0,56 mM) et d'EPI (0,34 mM)**



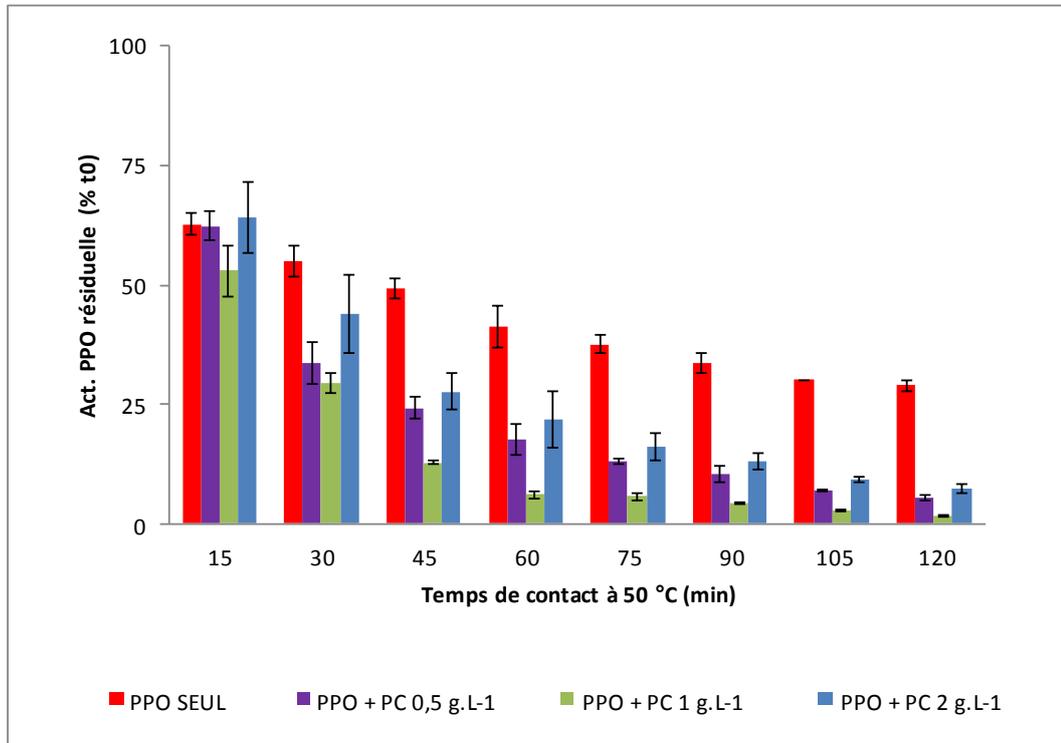
**Fig.33 : Concentration résiduelle en AA dans le mélange (CG-EPI-AA) en présence de PPO à 50 °C**



**Fig.34 : Activité PPO résiduelle en absence ou en présence de procyanidines de type B<sub>2</sub> (Prc) à 0,5 g.L<sup>-1</sup> à 20 et 50 °C**

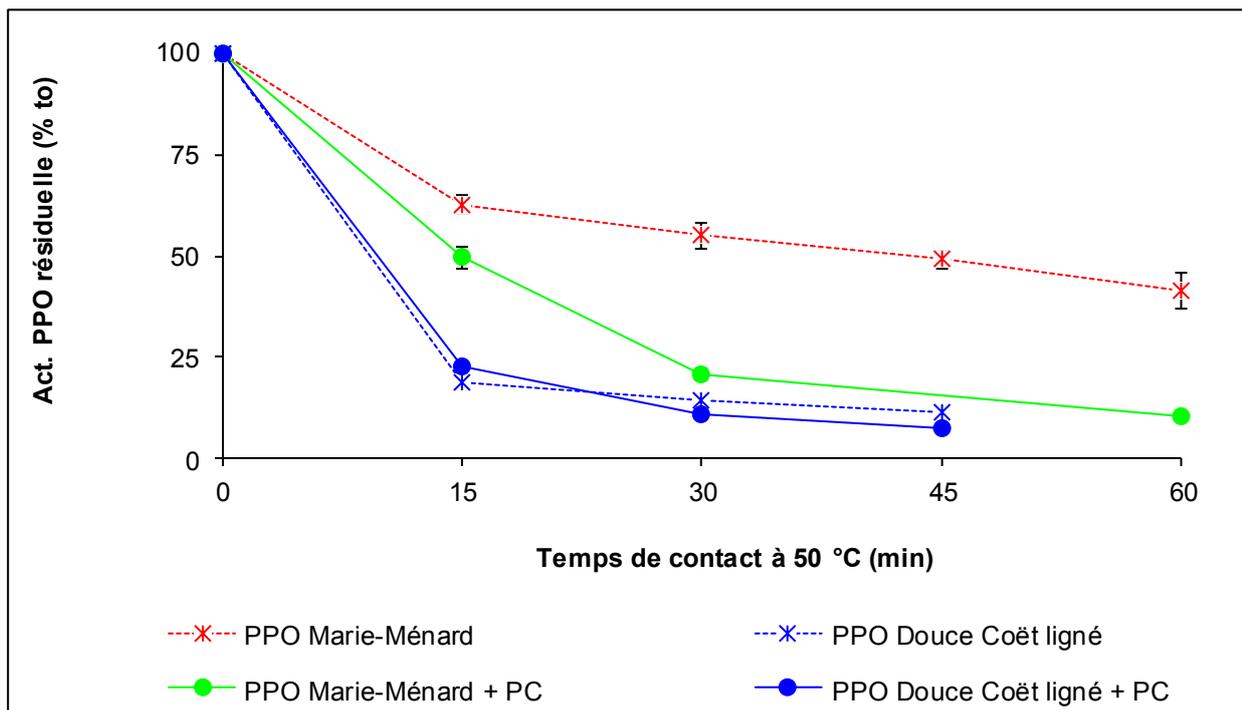


(a)

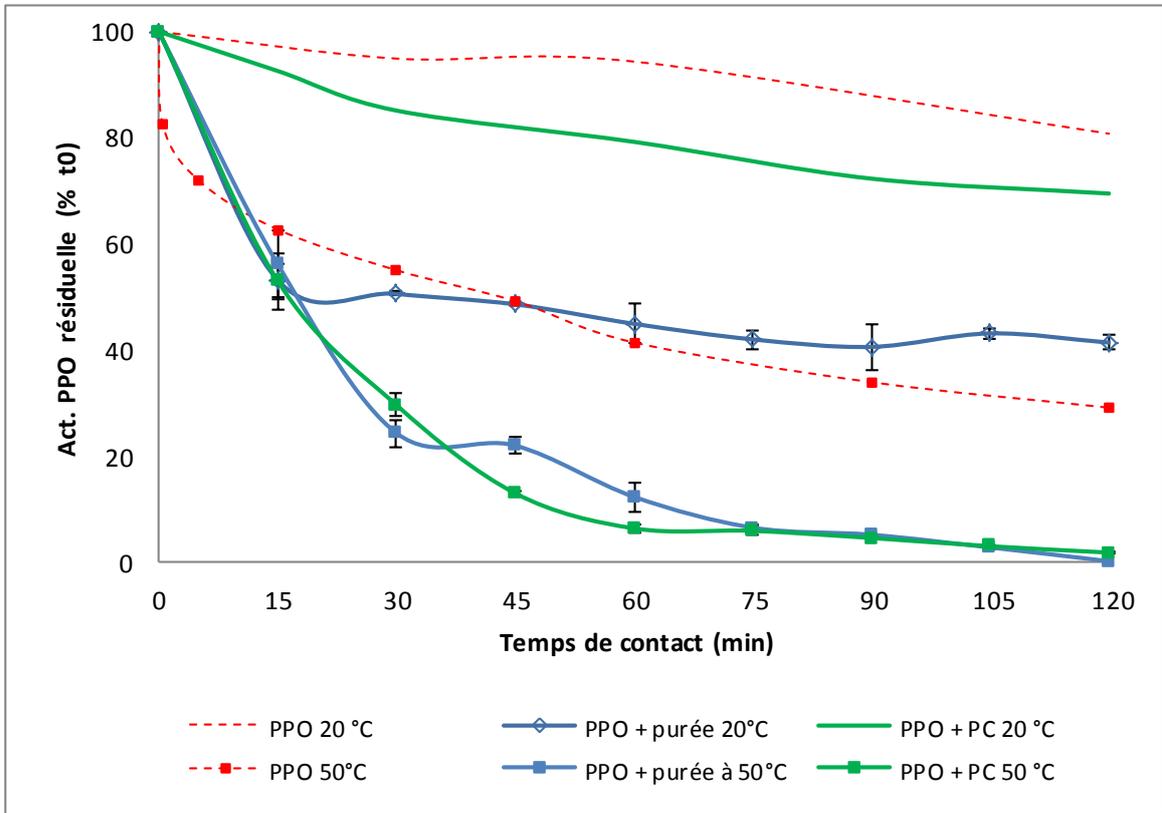


(b)

**Fig.35 : Evolution de l'activité PPO pour des concentrations variables en parois cellulaires (PC, 0,5 g.L<sup>-1</sup> à 2 g.L<sup>-1</sup>) à 20 °C (a) et 50 °C (b)**



**Fig.36 : Evolution de l'activité PPO en présence de parois cellulaires  $1 \text{ g.L}^{-1}$  à  $50^\circ\text{C}$ .  
Effet de l'origine et du mode de préparation de la PPO**



**Fig.37 : Comparaison activités PPO résiduelles en milieu purée de pomme diluée au 1/2 et en milieu parois cellulaires à 1 g.L<sup>-1</sup> à 20 et 50 °C**