



HAL
open science

Impact du pH et de la co-pigmentation sur la couleur des jus de pomme rosés

Julie Thomas

► **To cite this version:**

Julie Thomas. Impact du pH et de la co-pigmentation sur la couleur des jus de pomme rosés. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03594220

HAL Id: dumas-03594220

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03594220v1>

Submitted on 2 Mar 2022

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.

AGROCAMPUS OUEST

CFR Rennes

<p>Année universitaire : 2020-2021</p> <p>Spécialité : Master Biologie Agrosiences</p> <p>Spécialisation et option : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal, parcours Phytochimie, Qualité et Valeur d'Usage</p>	<p>Mémoire de fin d'études</p> <p><input type="checkbox"/> d'ingénieur de l'École nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage (AGROCAMPUS OUEST), école interne de l'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> de master de l'École nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage (AGROCAMPUS OUEST), école interne de l'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement</p> <p><input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
---	---

Impact du pH et de la co-pigmentation sur la couleur des jus de pomme rosés

Par : Julie THOMAS

Soutenu à Rennes le 25 juin 2021

Devant le jury composé de :

Président : Alain Bouchereau

Maîtres de stage : Jean-Michel Le Quéré, Sophie Guilois-Dubois

Enseignant référent et Examineur : Antoine Gravot

Autres membres du jury : Laurent Leport, Rapporteur

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celles d'AGROCAMPUS OUEST et l'université de Rennes 1

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation « Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France » disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier toute l'équipe PRP ainsi que les membres de l'IFPC pour leur accueil chaleureux, leur bienveillance et leur bonne humeur tout au long de mon stage.

Je remercie particulièrement Sylvain G., responsable de l'équipe, de m'avoir accueilli et intégré au sein de son équipe ; Sophie pour son encadrement et sa disponibilité ; et Jean-Michel pour ses conseils avisés (notamment sur Excel) et sa gentillesse. Merci également à Hélène pour m'avoir appris à me servir des équipements, à Agnès d'avoir commandé mes demandes de dernières minutes, à Gildas d'avoir mis à disposition mes équipements informatiques de travail, et à Angélique d'avoir géré tout l'administratif durant cette situation sanitaire compliquée.

Une pensée pour les membres de l'IFPC : Pascal, Céline, Séverine, Sylvain H., Hugues et Rémi ; ainsi qu'à Héloïse, avec lesquels j'ai passé de très bons moments. Je pense aussi à Margaux et Youcef, camarades de promo ayant fait leur stage sur le site du Rheu et avec qui j'ai partagé mon quotidien.

Je remercie mes parents et mes amis proches qui ont su me soutenir tout au long de ce stage et notamment durant la rédaction de ce mémoire.

Je suis reconnaissante d'avoir pu effectuer ce stage dans des conditions « normales » malgré la crise sanitaire, et cela grâce à toutes les personnes que j'ai citées plus haut alors : merci.

Liste des abréviations

ACN : acétonitrile

CAT : catéchine

CQA : acide chlorogénique

CPC : chromatographie de partage centrifuge

DHC : dihydrochalcones

DO : densité optique

DP : degré de polymérisation

EC : épicatechine

FA : flavanols

FO : flavonols

HCA : acides hydroxycinnamiques

HCOOH : acide formique

HPLC : chromatographie liquide à haute pression (ou performance)

L*A*B* : système L*a*b

MS : spectrométrie de masse

PLG : phloroglucinol

US : unité de surface

λ ou LO : longueur d'onde (en nm)

Table des matières

I.	Introduction.....	1
A.	Présentation de l'organisme d'accueil	1
B.	Contexte de l'étude	1
II.	Matériels et méthodes	3
A.	Matériels d'origine végétale	3
1.	Fraction brute d'anthocyane purifiée	3
2.	Co-pigments commerciaux	3
3.	Co-pigment extrait de jus de pomme	3
B.	Méthodes analytiques.....	3
1.	Quantification des polyphénols	3
2.	Méthodes de mesure de la couleur.....	5
C.	Méthodes de purification préparatives	6
1.	Repurification de l'anthocyane	6
2.	Obtention de flavan-3-ols	6
D.	Protocoles expérimentaux.....	8
1.	Analyse de l'influence du pH	8
2.	Evaluation de la co-pigmentation	8
III.	Résultats	10
A.	Analyses préalables de l'idéaïne purifiée.....	10
1.	Détermination du coefficient de réponse de l'idéaïne	10
2.	Analyse qualitative et quantitative de l'idéaïne purifiée.....	10
B.	Obtention de composés pour l'étude de l'influence du pH et de la co-pigmentation	11
1.	Repurification de l'anthocyane	11
2.	Obtention de flavan-3-ols	11
C.	Influence du pH sur la couleur.....	11
1.	Analyse des spectres de l'idéaïne en UV-visible à différents pH et modélisation.....	11
2.	Analyse de la couleur en L*a*b*	13
D.	Etude des effets de la co-pigmentation sur la couleur.....	14
1.	Analyse des spectres de l'idéaïne en UV-visible avec des co-pigments connus	14
2.	Tests de co-pigmentation avec les flavan-3-ols	15
IV.	Discussion	17
A.	Influence du pH sur la couleur.....	17
B.	Etude des effets de la co-pigmentation sur la couleur.....	18
V.	Conclusion	20
	Références bibliographiques	21

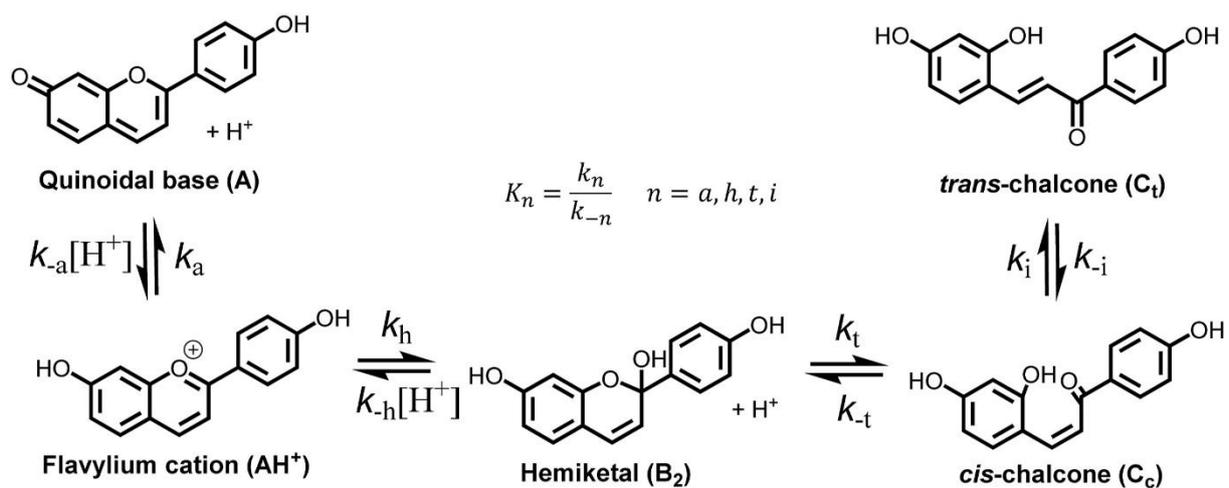


Figure 1 : Formes d'équilibre des composés de type flavylium en solutions aqueuses. (Cruz *et al.*, 2020).



Photo 1 : Idéaïne chlorure (commerciale, pure à > 97%) dans du tampon malate 20 mM pH 3.5 (à droite) et pH 5.1 (à gauche).

I. Introduction

A. Présentation de l'organisme d'accueil

Ce stage s'est déroulé au sein de l'équipe PRP (Polyphénols, Réactivité, Procédés), équipe faisant partie de l'unité de recherche BIA (Biopolymères, Interactions, Assemblages) de l'INRAE de Nantes. Bien que rattachée au site de Nantes, l'équipe PRP est localisée sur le site de l'INRAE du Rheu, à côté de Rennes. Cette équipe est en collaboration avec l'IFPC, l'Institut Français des Productions Cidricoles, dans le cadre d'une UMT, Unité Mixte Technologique, appelée Novacidre. Une plateforme de profilage métabolique et métabolomique (P2M2) se trouve dans les locaux et assure les analyses en chromatographie liquide et gazeuse pour l'équipe PRP, l'IFPC mais aussi pour d'autres équipes de l'INRAE du Rheu et d'ailleurs.

L'équipe est spécialisée dans l'implication des composés phénoliques durant l'élaboration de boissons issues de la transformation des pommes, en relation avec les qualités organoleptiques mais aussi nutritionnelles du produit fini. Son objectif est de comprendre les phénomènes physicochimiques et biochimiques se déroulant pendant la fabrication mais aussi lors de la conservation de ces boissons.

B. Contexte de l'étude

Ces dernières années, les cidres rosés à base de pommes à chair rouge, ont vu le jour sur le marché. Les jus de pomme rosés sont actuellement étudiés pour pouvoir proposer un nouveau type de jus de fruit, le jus de pomme étant le troisième jus le plus consommé en France en 2016, représentant 12% du marché des jus de fruits (Unijus, en ligne). Les pommes à cidres sont des variétés de pomme cultivées en majorité pour la fabrication de cidre mais certaines peuvent également être utilisées pour produire des jus. Certaines variétés de pomme comme *Baya Marisa*, *Redlove* et *Rouge de Ruys* ont une chair de couleur rouge, grâce à la présence d'anthocyanes dans sa chair, et majoritairement la présence d'idéaïne ou cyanidine-3-O-galactoside. Les anthocyanes sont des pigments végétaux dérivés du cation 2-phényl-benzopyrilium appelé cation flavylium. Ils constituent une classe de polyphénols hydrosolubles et sont souvent colorés, allant du jaune-orange au violet-bleu. Leur couleur dépend des formes d'équilibres (Figure 1), elles-mêmes dépendantes du pH. A pH acide ou très acide (< 3), les anthocyanes sont essentiellement sous leur forme cationique (AH^+) rouge, mais lorsque le pH augmente, le cation flavylium subit une déprotonation qui donne naissance à une quinoïde de couleur bleutée, qui modifie la teinte vers le mauve (Photo 1). A pH plus basique, en présence d'eau, l'espèce hémiacétale incolore est formée. Cette dernière peut subir une réaction de tautomérisation pour donner de la cis-chalcone (isomère de la trans-chalcone) qui elle, est de couleur jaune (Cruz *et al.*, 2020). Cette couleur est donc très instable en solutions aqueuses. Sa stabilisation est due : soit à des interactions non covalentes entre les anthocyanes elles-mêmes qu'on appelle auto-association ; soit à la complexation avec des métaux ioniques ou avec d'autres polyphénols non colorés (co-pigmentation intermoléculaire) ; soit à la complexation avec les résidus acylés des anthocyanes elles-mêmes (co-pigmentation intramoléculaire) (Trouillas *et al.*, 2016). Les structures moléculaires créées par co-pigmentation protègent l'anthocyane de l'hydratation et donc de la décoloration (Cruz *et al.*, 2020). La co-pigmentation des anthocyanes et notamment de l'idéaïne est donc possible dans un milieu riche en

divers composés. En fait, l'ajout de co-pigments est courant en industrie alimentaire, pour faire varier la palette de couleurs. La co-pigmentation peut aussi entraîner un effet bathochrome, c'est-à-dire un déplacement du spectre vers de plus grandes longueurs d'onde, ce qui peut modifier la couleur (Trouillas et *al.*, 2016).

Le pH et la co-pigmentation sont les deux paramètres les plus susceptibles d'influencer la couleur de l'anthocyane et donc des jus de pomme rosés, c'est pour cela que nous avons décidé de les étudier pour, à terme, comprendre les phénomènes de changements de couleur dans les jus de pomme à chair rouge. La finalité de ce stage étant l'optimisation d'un système de prédiction de la couleur d'un jus à partir d'un assemblage de divers jus (rosés ou non).

II. Matériels et méthodes

A. Matériels d'origine végétale

1. Fraction brute d'anthocyane purifiée

Ce projet s'est intéressé à la molécule responsable de la couleur rouge des jus rosés : l'idéaïne. Environ 4 mg d'idéaïne chlorure commerciale (> 97% de pureté, Extrasynthèse) était à ma disposition, ce qui est peu. Une fraction brute d'anthocyane a donc été purifiée par l'équipe avant mon arrivée. Une centaine de mg ont été obtenus par extraction et purification en CPC et HPLC semi-préparative, à partir d'un extrait polyphénolique de jus de pommes de la variété *Baya Marisa*. Cette idéaïne purifiée a été utilisée pour tester l'influence du pH sur la couleur.

2. Co-pigments commerciaux

Plusieurs molécules ont été utilisées pour la partie co-pigmentation. Quatre composés ont été choisis d'après la littérature (Bimpilas et al., 2016 et Molaeafard et al. 2021), qui sont : la caféine (Fluka Chemicals, 84677), l'acide chlorogénique (Sigma-Aldrich, CAS 327-97-9), l'acide *p*-coumarique (Sigma-Aldrich, C-9008) et l'acide caféique (Sigma-Aldrich, C-0625).

3. Co-pigment extrait de jus de pomme

Pour tester le possible effet de co-pigmentation entre l'idéaïne et les tanins, nous devons avoir à disposition une fraction de flavan-3-ols. Pour cela, nous sommes partis d'un extrait polyphénolique, disponible au laboratoire, issu de jus de pomme de la variété *Marie Ménéard*, connue pour sa teneur importante en polyphénols (32 g/kg de matière sèche) et particulièrement en procyanidines (environ 20 g/kg). L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Millet et al., 2019.

B. Méthodes analytiques

1. Quantification des polyphénols

a) Méthode HPLC-UV-MS

Le système HPLC-UV/Visible-MS a été utilisé pour les quantifications. Il est composé d'une pompe binaire à haute pression (HP séries 1100), d'un système automatique d'injection des échantillons (Thermo Finnigan Auto samples Surveyor) et d'une colonne (Agilent XDB-C18 3.5 μ m ; 2.1 x 150 mm) munie d'une pré-colonne (Agilent XDB-C18 3.5 μ m ; 2.1 x 12.5 mm). Ces dernières sont thermostatées à 30°C. Un détecteur à barrette de diodes (Thermo Finnigan Spectra System UV6000LP) permet de mesurer l'absorbance UV/Visible. L'ensemble est couplé à un spectromètre de masse (Finnigan LCQ-DECA) muni d'une source d'électronébulisation (appelée electrospray ou ESI) et d'un analyseur à piégeage d'ions (Ion Trap). La source ESI est utilisée en mode négatif. La détection en masse est effectuée avec les paramètres suivants : acquisition des spectres d'ionisation négatif en « full scan », détection balayant une gamme de *m/z* de 50 à 2000 pour obtenir les signaux correspondant à des ions moléculaires déprotonés [M-H]⁻. Le temps d'analyse d'un échantillon est de 72 minutes avec un débit constant de 0,2 mL/min. Pour l'analyse

Tableau 1 : Gamme d'étalonnage d'idéaïne chloride commerciale et quantités injectées.

Volume Idéaïne 90 µg/mL (µL)	25	50	125	250	500
Volume MeOH/Eau/HCOOH (µL)	975	950	875	750	500
Masse Idéaïne injectée (ng)	4.5	9	22.5	45	90

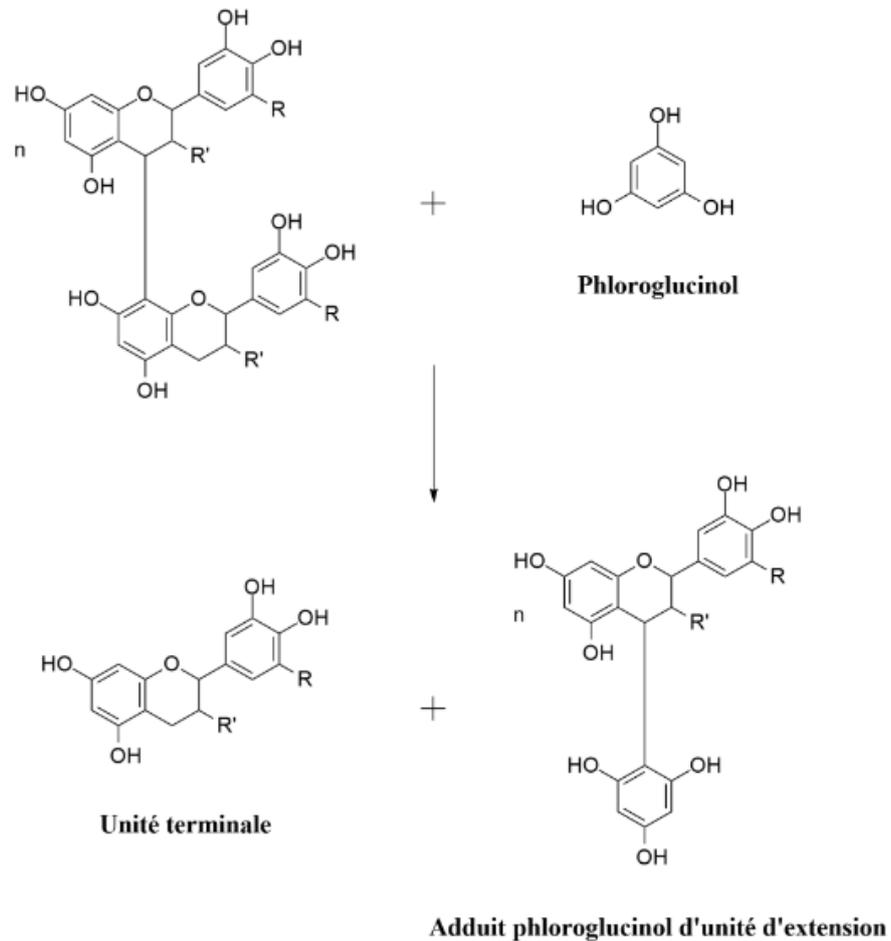


Figure 2 : Principe de la phloroglucinolyse (exemple d'un dimère de procyanidine) (d'après la méthode de Kennedy *et al.*, 2001).

des polyphénols, un gradient composé d'eau ultra-pure acidifiée à 0,1% d'HCOOH (solvant A) et d'acétonitrile acidifié à 0.1% d'HCOOH (solvant B) est utilisé. Le gradient a été réalisé de la façon suivante : initial, 3% de B ; 0-3 min, gradient linéaire jusqu'à 7% de B ; 3-21 min, gradient linéaire jusqu'à 13% de B ; 21-27 min, 13% de B isocratique ; 27-41 min, gradient linéaire jusqu'à 20% de B ; 41-51 min, gradient linéaire jusqu'à 45% de B suivi d'un lavage avec 90% de B et reconditionnement de la colonne à 3% de B. Une fois les données acquises elles sont traitées avec le logiciel Xcalibur.

b) Détermination du coefficient de réponse de l'idéaïne et quantification

L'idéaïne étant une molécule non référencée dans la base de données polyphénols de l'équipe, son coefficient de réponse a été déterminé pour pouvoir la quantifier. Pour cela, une solution mère d'idéaïne commerciale à 90 µg/ml dans du méthanol/eau/acide formique (MeOH/H₂O/HCOOH, 50/49/1) a été réalisée, puis une gamme de cinq solutions à différentes concentrations a été préparée (de 2.25 à 45 µg/mL). 2 µL de chaque point de gamme ont été injectés en HPLC-UV-MS afin de tracer un graphe de l'aire du pic en fonction de la quantité injectée (en µmol), correspondant à des quantités injectées d'idéaïne comprises entre 4.5 ng et 90 ng (Tableau 1). La courbe de tendance obtenue est linéaire, et la pente correspond au coefficient de réponse, exprimé en US/µmol.

Grâce au coefficient de réponse de l'idéaïne calculé en amont, nous avons donc quantifier et ainsi déterminer le degré de pureté de notre anthocyane (en %). Cette vérification de pureté s'est faite en préparant une solution mère à 1.2 g/L (pesée de 6 mg dans 5 mL) dans du tampon malate 5 mM à pH 3.5. Puis cette solution a été diluée au 25^{ème} dans du MeOH/H₂O/HCOOH (50/49/ 1), filtrée sur PTFE 0.45µm, mise en vial et injectée en HPLC-UV-MS (2µL). La concentration théorique de la solution injectée était de 48µg/mL (soit 96 ng théorique injecté).

c) Phloroglucinolyse

Afin d'identifier toute trace possible de flavan-3-ols dans la poudre d'idéaïne purifiée, une phloroglucinolyse a été effectuée. En effet, notre idéaïne doit être exempte de flavan-3-ols car ces derniers seront testés en tant que co-pigments par la suite. La méthode de phloroglucinolyse a été décrite par Kennedy et ses collaborateurs en 2001. Elle consiste à dépolymériser les polymères de tanins par rupture des liaisons interflavanes en condition acide et à chaud, en présence d'un agent nucléophile, le phloroglucinol. Les unités d'extensions sont très réactives et forment des adduits avec le phloroglucinol, alors que les unités terminales sont libérées sous forme de monomères de catéchine (EC et CAT). Le principe est montré Figure 2. Ainsi, la quantité de flavan-3-ols (monomères de catéchines + tanins) présents dans l'échantillon correspond à la somme des quantités de produits formés, qui sont repérables et quantifiables en HPLC-UV-MS. Le protocole réalisé est le suivant :

- Dans une masse connue de poudre anhydre, ajout de 100 µL de méthanol/HCl 0.3N
- Ajout de 200 µL de mélange phloroglucinol (75 g/L) + vitamine C (15 g/L) et mélanger
- Incubation 30 minutes dans un bain marie à 50 °C
- Refroidissement dans la glace 5 minutes
- Ajout de 300 µL d'acétate de sodium (0.2M) pour stopper la réaction

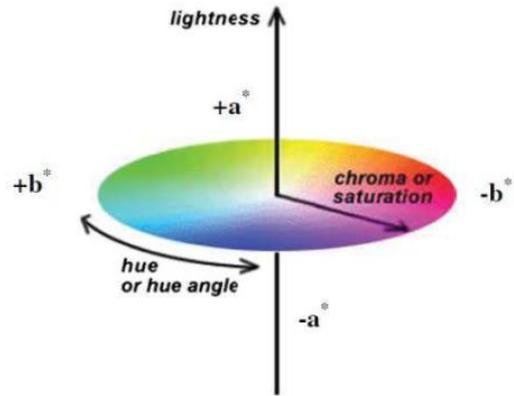
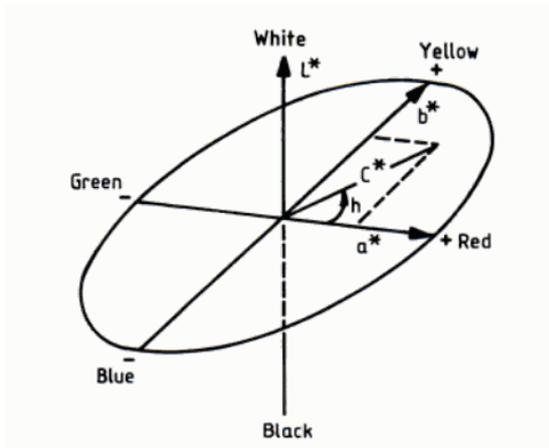


Figure 3 : Modèles $L^*a^*b^*$ et $L^*C^*h^\circ$ (d'après Zollinger, 2003).

L'échantillon est filtré sur filtre 0.45 μm et injecté en HPLC-UV-MS, les données obtenues analysées avec le logiciel Quan Xcalibur. La surface des pics UV à 280 nm des produits formés permet une quantification des flavan-3-ols, connaissant les différents coefficients de réponse des monomères de catéchine et de l'adduit, déterminés dans les mêmes conditions.

2. Méthodes de mesure de la couleur

a) *Mesure des spectres*

Les spectres de l'anthocyane sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible qui éclaire l'échantillon en lumière blanche et mesure l'absorbance (ou densité optique, DO) par une barrette de diode. Ainsi, l'ensemble du spectre est obtenu très rapidement (1 seconde). La solution peut être mesurée en cuve (volume d'environ 800 μL à 1 mL, trajet optique de 1 cm) ou en plaque. La plaque LVis est composée d'une lamelle transparente en quartz sur laquelle peuvent être déposées 16 gouttes de 3 à 5 μL chacune. Le positionnement d'un abattant, en quartz également, permet de fixer la longueur traversée par le faisceau (0.1 mm), l'ajustement de la DO étant réalisé directement dans le logiciel « StarNano ». Cette plaque spécifique a été choisie, plutôt que la cuve, pour pouvoir mesurer les spectres à partir de très petits volumes, pour éviter de gaspiller l'anthocyane et les co-pigments préparés. Les résultats obtenus sont des graphes $\text{DO} = f(\lambda)$.

b) *Calcul en $L^*a^*b^*$*

Le système $L^*a^*b^*$, est un mode de colorimétrie qui consiste à déterminer trois paramètres pour quantifier la perception de la couleur par l'œil humain selon les travaux de la commission internationale de l'éclairage. Le paramètre L^* , représentant l'axe vertical, correspond à la luminance. Sa valeur est comprise entre 0 et 100. La valeur 0 représente le noir, l'absorption totale ; alors que la valeur 100 représente le blanc, la réflexion ou la transmittance totale. L'axe L^* est donc dit neutre au niveau des couleurs. Ce sont les deux autres axes orthonormés a^* et b^* qui vont définir la couleur. Ces deux valeurs sont des coordonnées du cercle équatorial de la sphère des couleurs car il s'agit bien d'un système en 3 dimensions (Figure 3). Les axes sont parfois nommés axes du rouge et du jaune : le rouge (ou le vert à l'opposé) étant exprimés par a^* pour des valeurs faibles ou nulles de b^* (a^* positif si rouge et négatif si vert) ; le jaune (ou le bleu) étant exprimés par b^* pour des valeurs faibles ou nulles de a^* , (b^* positif si jaune et négatif si bleu). Mais en réalité une couleur est définie par les deux valeurs (a^* et b^*) qui permettent de positionner la couleur sur le cercle (Le Deun, 2016).

Plutôt que les paramètres a^* et b^* qui sont des coordonnées cartésiennes on peut exprimer la couleur en coordonnées polaires avec C^* (chroma = saturation) qui représente la distance entre la couleur et le centre du cercle chromatique, descripteur « quantitatif » de la couleur qui représente son intensité ou au contraire sa « pâleur » ; et h° (hue = teinte) qui est l'angle en degré (dans le sens trigonométrique depuis la valeur 0 ou 360 représentant la couleur rouge), les angles 90° , 180° et 270° décrivant respectivement les teintes jaune, verte et bleue. Le codage $L^*C^*h^\circ$ est une expression alternative au $L^*a^*b^*$. Ce système permet de reproduire toutes les nuances de couleurs perceptibles par l'œil humain.

Les mesures de DO des spectres obtenus au spectrophotomètre sont intégrées dans une feuille de calcul Excel déjà existante permettant de calculer les paramètres $L^*a^*b^*$ à partir des

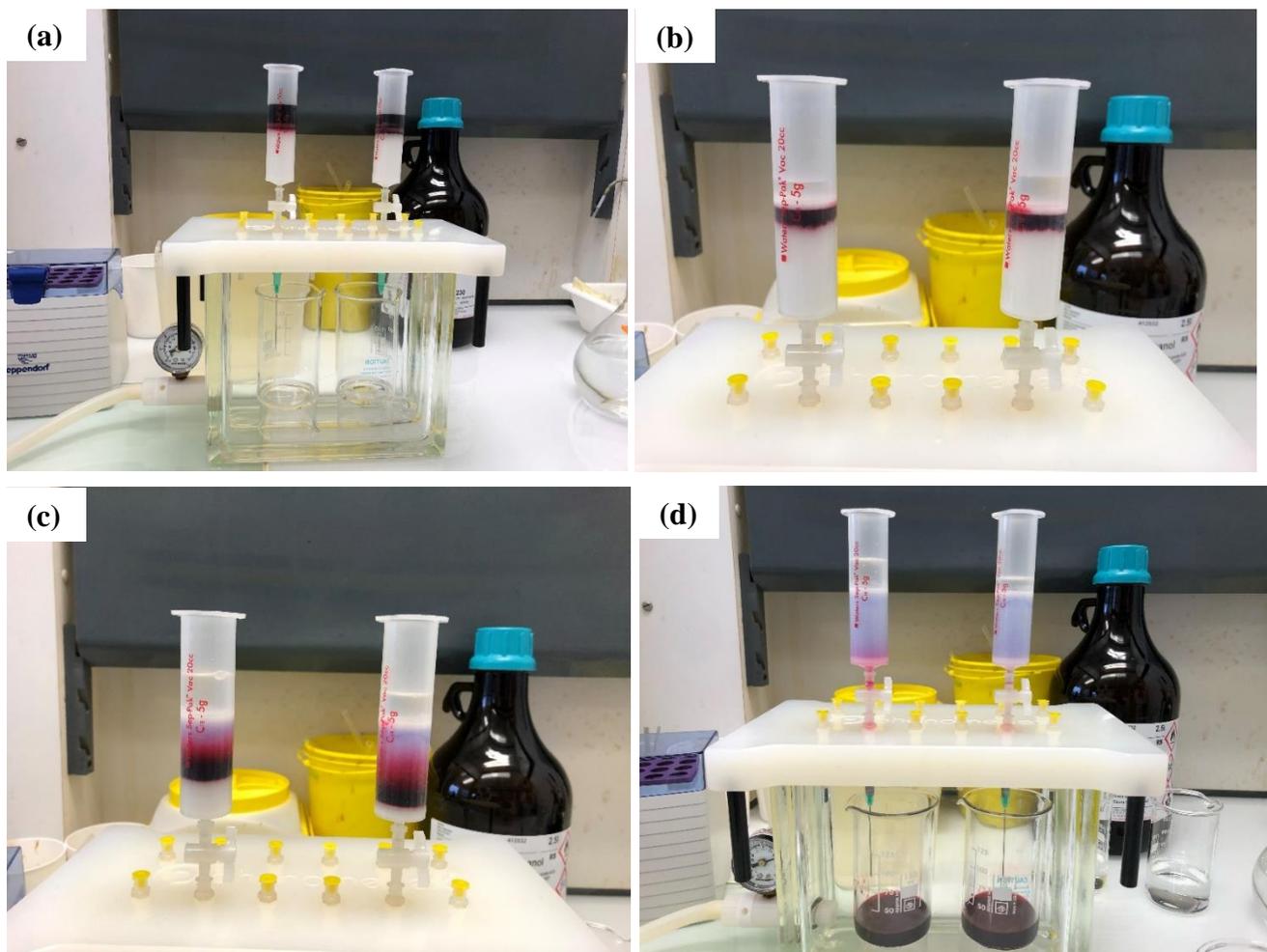


Photo 2 : Extraction en phase solide de l'idebenone sur SEP-PAK (26/01/2021, INRAE du Rheu).
(a) Passage de l'idebenone sur la colonne ; (b) Lavage à l'eau acidifiée ; (c) et (d) Elution à l'éthanol/eau acidifiée (50/50).

spectres. Pour se faire, les calculs classiques et connus du système $L^*a^*b^*$ sont utilisés. L'illuminant ID65 est utilisé comme lumière blanche (lumière du jour) qui correspond à l'énergie émise à chaque longueur d'onde. Ce spectre est multiplié par le pourcentage des rayonnements traversant une solution colorée puis par les trois courbes de réponses de l'œil à chaque longueur d'onde (l'œil contient 3 bâtonnets émettant chacun une réponse différente = 3 courbes). On obtient alors par intégration numérique, trois valeurs qui correspondent aux trois réponses de l'œil. Dans notre cas on utilise la transmittance T car on regarde la couleur par transparence (milieu liquide limpide). La transmittance est le rapport entre l'intensité du rayonnement transmis à l'intensité incidente et peut être calculée à partir de l'absorbance car $DO = -\log(T)$.

C. Méthodes de purification préparatives

1. Repurification de l'anthocyane

Une purification supplémentaire de notre idéaline a été réalisée car le degré de pureté de la poudre déterminée par le ratio de la concentration réelle de la solution préparée sur la concentration théorique (par rapport à la pesée théorique) était de 50%. Celle-ci a été réalisée en éliminant les impuretés par extraction en phase solide (SPE). Des cartouches SEP-PAK (Waters : WAT036925), contenant 5 g d'une phase de silice C18 greffée (phase inverse) à fort pouvoir hydrophobe ont été utilisées. Chaque colonne peut supporter jusqu'à 40 mg de polyphénols. Ces cartouches peuvent retenir les analytes faiblement hydrophobes. Les polyphénols en solutions aqueuses sont retenus sur la phase. Une étape de rinçage des cartouches avec une solution aqueuse permet l'élimination des composés indésirables. Les polyphénols sont ensuite élués par une solution acidifiée contenant 50 % d'éthanol et 50% d'eau. Certaines étapes sont montrées sur la Photo 2. Cette extraction permet donc la purification des polyphénols en éliminant les composés indésirables comme les sucres ou les sels par exemple. Le protocole est le suivant :

- Conditionner la phase stationnaire des colonnes SEP-PAK de 5 g : faire passer 20 mL de méthanol, puis 40 mL d'eau acidifiée avec 0.1 % d'HCl
- Faire passer sur la colonne la solution aqueuse de polyphénols, les polyphénols sont alors retenus sur la colonne
- Laver avec 40 mL d'eau acidifiée à 0.1% d'HCl pour éliminer les composés indésirables non retenus sur la colonne
- Eluer les polyphénols simples avec 40 mL de mélange éthanol/eau (50/50) avec 0.1% d'HCl pour décrocher les polyphénols fixés sur la phase stationnaire
- Répéter ces étapes 3 fois et pooler les solvants récupérés (contenant les polyphénols)
- Evaporer les solvants au rotavapor. L'extrait est transféré dans un flacon à sertir taré, puis congelé et lyophilisé
- Peser la poudre anhydre

2. Obtention de flavan-3-ols

La fraction de flavan-3-ols (tanins et monomères de catéchines) a été purifiée à partir d'1 g d'extrait polyphénolique de jus de pomme à cidre de la variété *Marie Ménéard*. La procédure d'obtention a été réalisée en 2 étapes : une première étape a permis d'éliminer les acides hydroxycinnamiques (présents en quantités majoritaires dans l'extrait polyphénolique) par la

technique de chromatographie de partage centrifuge (CPC), puis une seconde étape de purification ultime a été réalisée par HPLC préparative pour la récupération d'un extrait purifié de flavan-3-ols (élimination des flavonols et des dihydrochalcones).

La CPC est une méthode douce de séparation et d'isolement de composés naturels à l'échelle préparative. Cette technique chromatographique liquide-liquide est basée sur le partage des solutés entre 2 phases liquides non miscibles préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants (ou solutions). Une phase est maintenue stationnaire dans une colonne par une force centrifuge lors de la rotation d'un rotor autour de l'axe. L'autre phase est pompée au travers et joue le rôle de phase mobile permettant ainsi des échanges entre les deux phases. Les principaux avantages de la CPC sont : l'absence de support solide, donc aucune absorption irréversible ; pas de dégradation ou de dénaturation des échantillons ni de perte de composés d'intérêt ; la capacité de chargement importante des échantillons (jusqu'à 1 à 2 g ici) ; le fractionnement de molécules avec une large gamme de polarité ; une consommation de solvant réduite (impact économique et environnemental) ; et la rapidité de cette technique de séparation. Le fractionnement de deux composés différents par CPC exige de choisir un système de solvant pour lequel le rapport des coefficients de partition (K_d) des 2 composés soit supérieur à 1.5. Dans notre cas, aucun système de solvant ne permet d'avoir des K_d de flavan-3-ols suffisamment différents de ceux des autres classes de polyphénols présents dans l'extrait de départ, pour pouvoir utiliser la CPC en mode normal tel que décrite précédemment. La CPC a donc été utilisée en mode « pH-zone-refining » (pH-ZRCPC), en faisant varier le pH dans les deux phases constitutives du système (méthodologie mise au point au laboratoire). Les acides hydroxycinnamiques étant ionisables de par leur fonction carboxylique, ils présentent une différence de polarité suffisante entre leur forme neutre et ionisée pour inverser leurs constantes de distributions dans le système biphasique sélectionné, permettant leur élimination par ce type de CPC.

Le système de CPC Kromoton utilisé est couplé au système HPLC Préparative Gilson PLC2020 comprenant une pompe, une vanne d'injection équipée d'une boucle d'injection, d'un détecteur UV à double longueur d'onde et d'un collecteur de fraction. Le système de solvant utilisé est composé d'un mélange éthylacétate/butanol/eau (3/2/5). Après mélange et décantation, les 2 phases ont été séparées. La phase stationnaire organique (phase supérieure) a été acidifiée avec 10 mM de TFA (acide trifluoroacétique) et la phase mobile aqueuse avec 10 mM de soude (pH-ZRCPC réalisée en mode descendant). La colonne a été remplie avec de la phase stationnaire acidifiée, à un débit de 5 mL/min et une vitesse de rotation de 1200 rpm. L'extrait polyphénolique, solubilisé dans un mélange des deux phases et acidifié, a alors été injecté, et la chromatographie démarrée en pompant immédiatement la phase mobile aqueuse. En sortie de colonne les fractions ont été collectées toutes les 3 minutes. Enfin, une étape d'extrusion finale a été réalisée en remplaçant la phase aqueuse par la phase organique. L'analyse des fractions en HPLC-UV-MS a permis de déterminer leur composition et de choisir les fractions d'intérêt exemptes d'acides hydroxycinnamiques. Après poolage et élimination des solvants, l'extrait intermédiaire a été lyophilisé pour l'étape de purification ultime par HPLC préparative.

L'étape de purification ultime a été réalisée avec le même système de chromatographie que précédemment, couplé à une colonne préparative packée avec de la phase inverse Lichrospher 100

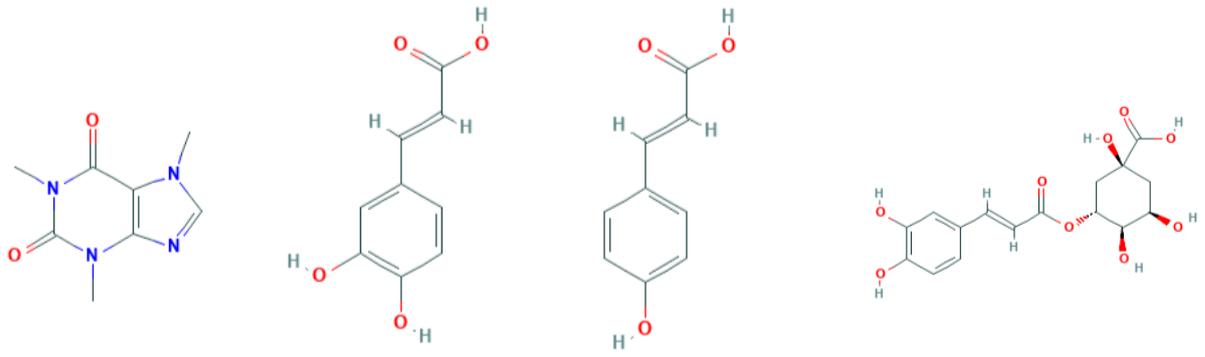


Figure 4 : Structures (de gauche à droite) de la caféine, de l'acide caféique, de l'acide *p*-coumarique et de l'acide chlorogénique (PubChem, en ligne).

RP-18, 12 μm (Merck, Darmstadt, Germany). L'extrait intermédiaire lyophilisé a été solubilisé dans 5 mL d'un mélange acétonitrile/eau (20/80) puis filtré et injecté sur la colonne à un débit de 40 mL/min. Les solvants utilisés étaient de l'eau acidifiée avec 0.1% d'acide formique (A) et de l'acétonitrile acidifié avec 0.1% d'acide formique (B). Les conditions chromatographiques étaient les suivantes : 0-30 min, 20% de B isocratique ; 30-35 min, gradient linéaire jusqu'à 90% de B ; 35-40 min, 90% de de B isocratique ; puis reconditionnement de la colonne avec 20% de B. Le signal UV a été enregistré à 280 nm et à 320 nm. Les fractions éluées ont été collectées manuellement et analysées par HPLC-UV-MS. Les fractions contenant uniquement les flavan-3-ols ont été poolées, pour obtenir un extrait brut après élimination des solvants et lyophilisation.

D. Protocoles expérimentaux

1. Analyse de l'influence du pH

Une solution mère d'idéaïne à 1 g/L théorique a été préparée à partir de poudre purifiée, diluée dans du tampon malate 5 mM à pH 3.5 (pH moyen des jus de pomme). Pour faire varier le pH, huit solutions tampons malate à différents pH sont préparées : tampons malate 20 mM, à pH 3, 3.3, 3.6, 3.9, 4.2, 4.5, 4.8, et 5.1. Un volume de 60 μL de solution mère d'idéaïne a été diluée au 20^{ème} dans 1140 μL de tampon malate 20 mM à un pH défini (chronomètre déclenché à ce moment). Le mélange réalisé a été vortexé aussitôt, puis transféré en cuve, recouverte d'un parafilm. Les spectres UV-Visible ont été acquis à différents temps (T0, T1h, T2h, T4h et T24h), afin de pouvoir observer la stabilité de l'anthocyane en solution. Après les mesures au temps T4h (estimé être un temps où les solutions sont stables), 200 μL des dilutions au 20^{ème} des solutions à chaque pH sont filtrés puis mis en vials pour être injectés en HPLC-UV/Visible-MS.

2. Evaluation de la co-pigmentation

La co-pigmentation étant un phénomène connu, l'objectif premier était de vérifier l'existence de celle-ci sur l'idéaïne, avec des molécules ayant été référencées comme des co-pigments potentiels, par la mesure des spectres UV-Visible dans des conditions proches de celles des jus de pomme. Dans un second temps, nous avons réalisé des tests de co-pigmentation sur les flavan-3-ols obtenus par CPC et HPLC préparative.

Quatre co-pigments potentiels ont été retenus : la caféine, co-pigment connu de la littérature scientifique (Mendoza *et al.*, 2019) est testé en tant que produit de référence bien que ce composé soit absent des jus de pomme ; l'acide chlorogénique ou acide caféoylquinique, acide présent en grande quantité et très étudié dans les boissons à base de pommes ; l'acide *p*-coumarique, dérivé de l'acide cinnamique présent en petite quantité chez les pommes ; et l'acide caféique (Gris *et al.*, 2007), composé pouvant se retrouver à l'état de trace dans les jus (voir Figure 4 pour leurs structures). La concentration en idéaïne pour les expériences a été fixée à 120 mg/L, concentration moyenne retrouvée dans les jus de pomme à chair rouge d'après Malec *et al.*, 2014. Différents rapports molaires co-pigment/anthocyane ont été testés, allant de 1 à 50. Les mélanges ont été réalisés volume à volume (100 μL d'anthocyane + 100 μL de co-pigment testé). Les solutions ont donc été préparées à une concentration double de celle étudiée (240 mg/L pour l'idéaïne par exemple). La co-pigmentation a été testée à pH 3.5, pH moyen retrouvé en conditions jus de

pomme ; mais aussi à pH 5.1, pour observer les éventuels effets du pH sur les interactions entre les co-pigments et l'anthocyane. Les solutions de départ ont été réalisées dans du tampon malate 20 mM à pH 3.5 ou 5.1. Les tampons correspondants ont servi de « blanc » pour les mesures au spectrophotomètre. Les spectres UV-Visible des mélanges ont été mesurés en plaque LVis et comparés aux spectres des molécules seules (à même concentration finale) et obtenus dans les mêmes conditions.

Ensuite, les flavan-3-ols purifiés (contenant des oligomères de procyanidines et des monomères de catéchines, de DP moyen de 3) ont aussi été testés en tant que co-pigment potentiels avec l'idéaïne (Dueñas *et al.*, 2006). Comme décrit ci-dessus, une solution d'idéaïne à 240 mg/L théorique, dans du tampon malate 20 mM à pH 3.5 ou 5.1 (en fonction de la condition), a été mélangée à une solution de flavan-3-ols (réalisée dans le même tampon) de ratio molaire dix fois supérieur à l'anthocyane. La concentration en flavan-3-ols a été calculée de façon théorique en équivalent catéchine (monomère des tanins condensés). La masse molaire d'une unité catéchine (290.31 g/mol) a donc été prise en compte pour le calcul du ratio molaire anthocyane/tanins de 10.

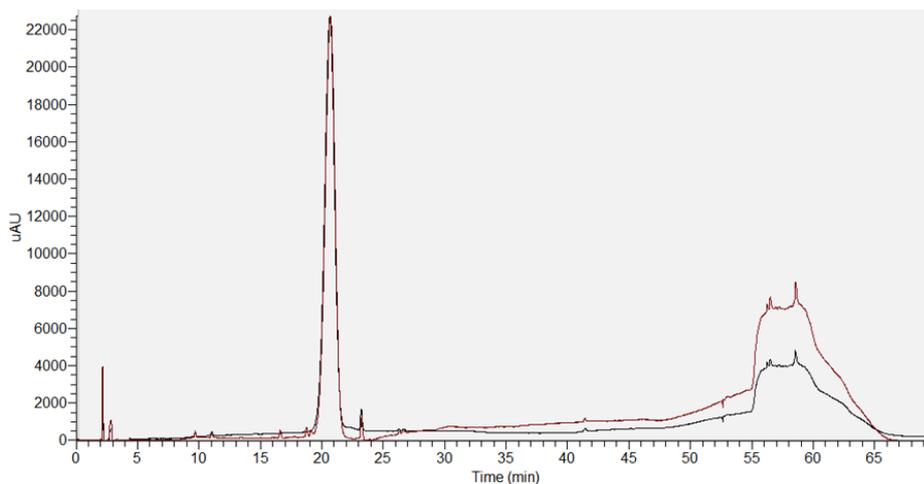


Figure 5 : Profil chromatographique en UV-visible (sur toute la gamme de longueur d'onde) de l'ideïne purifiée (rouge) et de la commerciale (noire).

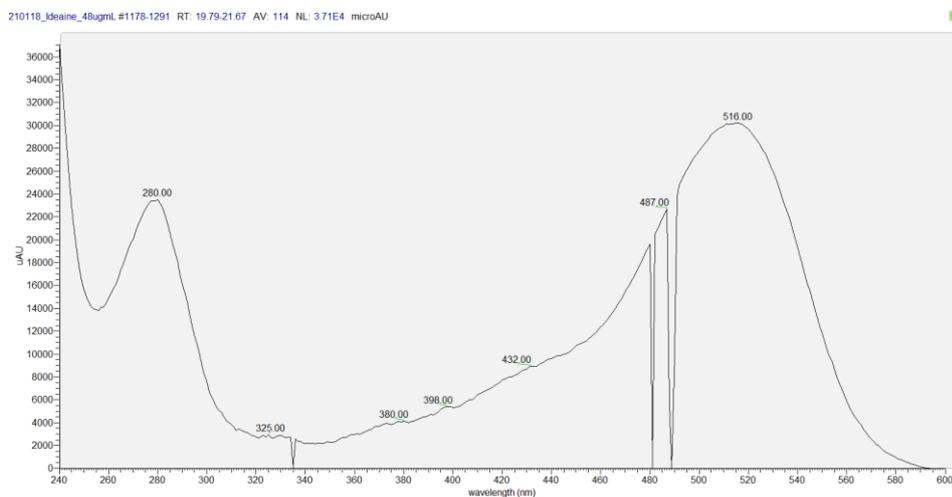


Figure 6 : Spectre UV-visible du pic à 20,7 minutes de l'ideïne purifiée.

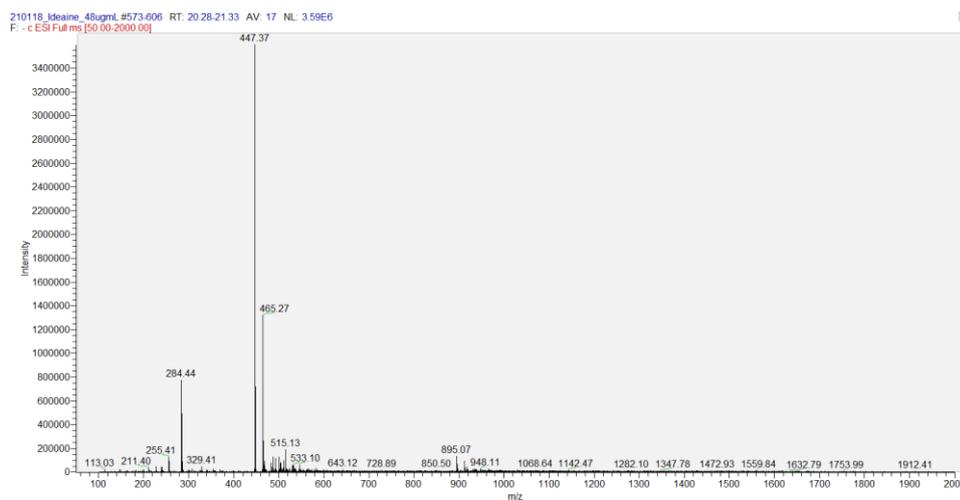


Figure 7 : Spectre de masse (en mode d'ionisation négatif) du pic à 20,7 minutes de l'ideïne purifiée.

III. Résultats

A. Analyses préalables de l'idéaïne purifiée

1. Détermination du coefficient de réponse de l'idéaïne

L'injection des solutions d'idéaïne commerciale à différentes concentrations a permis de tracer un graphe de l'aire (Unité de surface ou US) en fonction de la quantité injectée (en μmol). La courbe de tendance est linéaire et la pente correspond au coefficient de réponse exprimé en $\text{US}/\mu\text{mol}$. La valeur obtenue était de $2.6940 \cdot 10^{10} \text{ US}/\mu\text{mol}$. Ce coefficient a été utilisé pour la quantification de l'anthocyane dans les différentes solutions préparées.

2. Analyse qualitative et quantitative de l'idéaïne purifiée

Nous avons réalisé la quantification d'une solution d'idéaïne purifiée (dont la teneur pondérale était de $48 \mu\text{g}/\text{mL}$) grâce au coefficient de réponse déterminé précédemment. Nous avons ainsi pu calculer un degré de pureté par le ratio de la concentration réelle de la solution obtenue par HPLC-UV-MS sur la concentration théorique. Cela a permis de montrer que l'idéaïne obtenue par CPC à partir de d'extrait polyphénolique de jus de pomme *Baya Marisa*, n'était pas pure. La concentration réelle étant de $28.61 \mu\text{g}/\text{mL}$, le degré de pureté n'était que de **59.6%** seulement.

Le degré de pureté obtenu étant trop faible, le profil UV-Visible-MS de l'idéaïne purifiée a été comparé à celui de l'idéaïne commerciale. Le profil à 520 nm de l'idéaïne purifiée montre un seul pic bien résolu à 20.87 minutes, ce qui correspond bien à l'anthocyane.

La superposition des profils UV-Visible des idéaïnes commerciale et purifiée (Figure 5) montre que dans les 2 poudres, les pics autres que celui de l'idéaïne ne dépassent pas 1% de la surface de celui de l'anthocyane. Néanmoins, un amas de pics mal résolus en fin de chromatogramme pourrait suggérer la présence de composés moins polaires, en quantité plus importante dans la poudre d'idéaïne purifiée, pouvant potentiellement être des tanins.

Le profil à 280 nm de l'idéaïne purifiée est comparé à celui de la commerciale à 280 nm . On observe également un massif de pics après 50 minutes ce qui confirme qu'il pourrait s'agir de tanins, 280 nm étant la longueur d'onde d'absorption de ces derniers.

Le spectre UV-Visible correspondant au pic à 20.7 minutes (décalage de 0.2 secondes en PDA-UV) nous indique un maximum d'absorption à 516 nm ainsi qu'une absorption à 280 nm (Figure 6), tout comme le spectre UV-Visible de l'idéaïne commerciale. Le spectre de masse de ce même pic (Figure 7) est le même que pour la commerciale : un m/z de 447 en $[\text{M-H}]^{2-}$ prédomine, soit une masse de $449 \text{ g}/\text{mol}$, ce qui correspond à la masse molaire de l'idéaïne. Le m/z de 465 représente la forme hydratée et celui de 284 reste inconnu.

Il s'agit bien de notre molécule d'idéaïne et il ne semble pas y avoir d'autres molécules interférentes.

Après phloroglucinolyse réalisée en duplicat et analyse par HPLC-UV-MS, les pics d'adduits et de monomères de catéchine ont été quantifiés, afin de connaître réellement le pourcentage de flavan-3-ols présents dans la poudre d'idéaïne purifiée. Le pourcentage est de

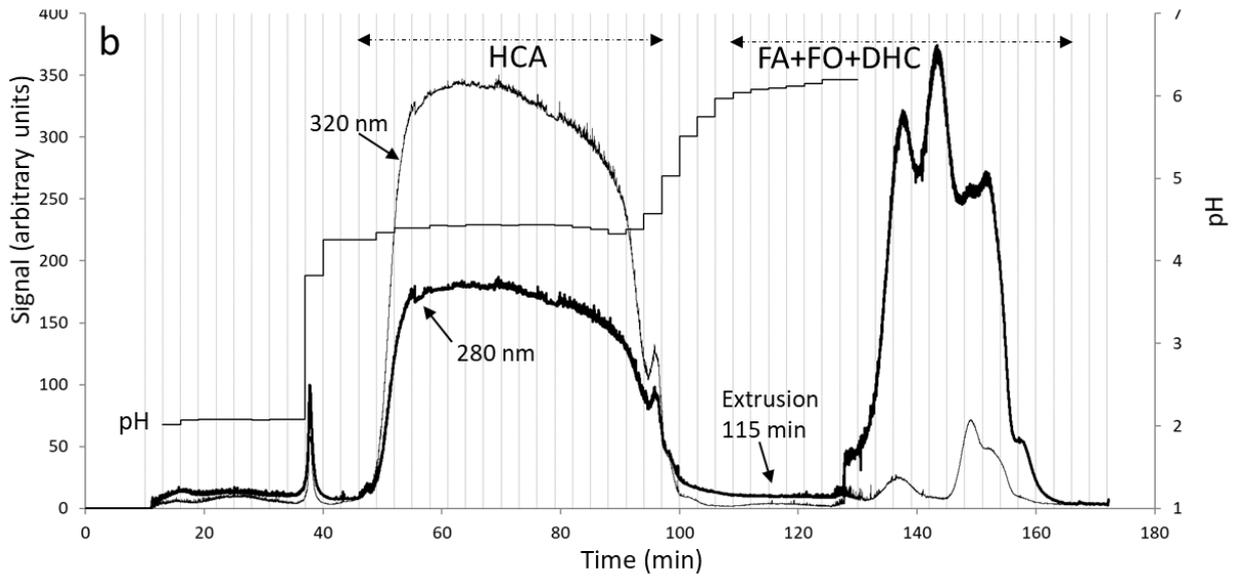


Figure 8 : Graphe de la pH-ZRCPC sur 1 g d'extrait polyphénolique de jus de pomme *Marie Ménéard*. Le gradient de pH ainsi que les signaux à 280 et 320 nm sont montrés. (HCA = acides hydroxycinnamiques, FA = flavanols, FO = flavonols, DHC = dihydrochalcones.)

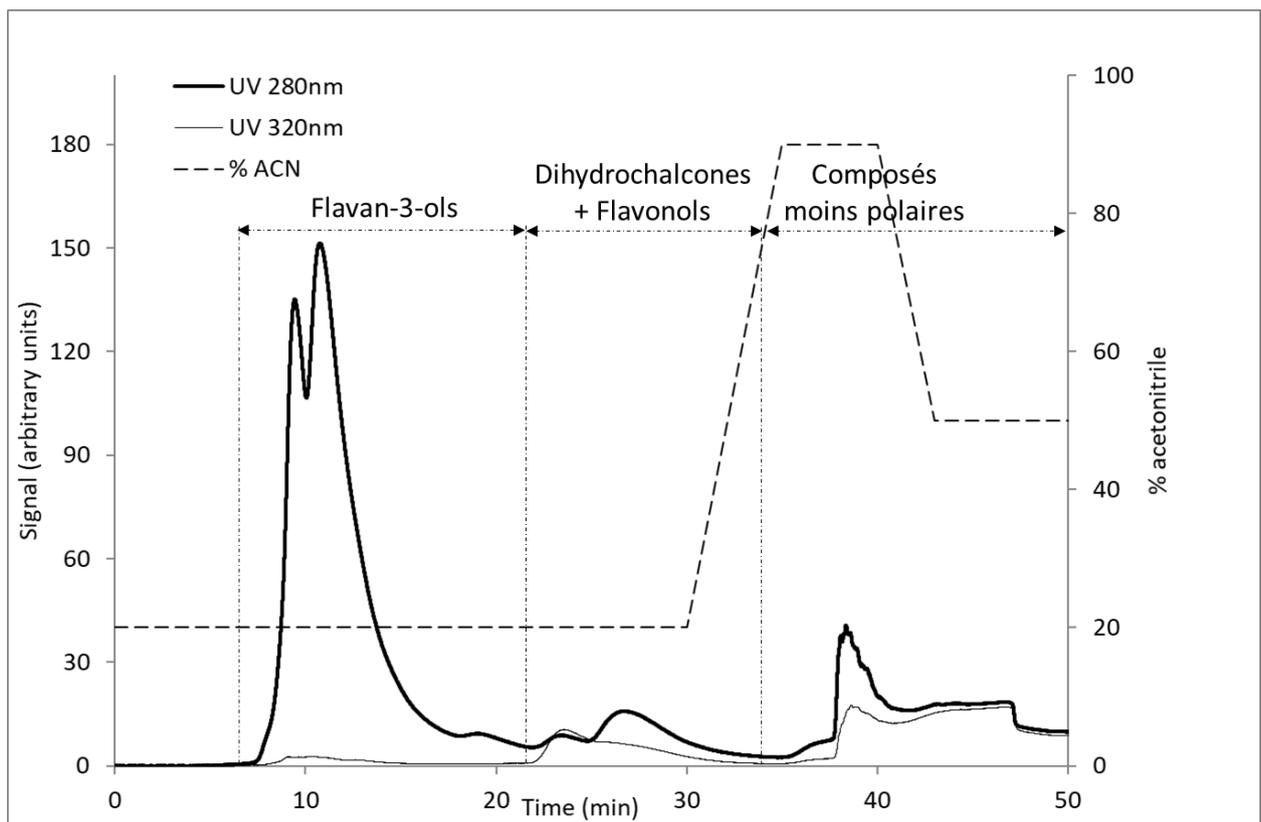


Figure 9 : Profil UV de l'HPLC préparative effectuée sur l'extrait intermédiaire contenant FA+FO+DHC. Le gradient en ACN est représenté en pointillés. les signaux à 280 et 320 nm sont montrés respectivement en traits épais et fins.

3,1% et correspond à une quantité non négligeable en flavan-3-ols. De ce fait, la poudre d'idéaïne purifiée n'a pas pu être utilisée directement dans le cas de l'étude de la co-pigmentation. Pour autant, la quantité en flavan-3-ols présente dans la poudre n'explique pas le faible pourcentage de pureté. 2 hypothèses sont possibles : 1) l'idéaïne purifiée se trouverait sous forme de sel (idéaïne formiate), dû au fait que la purification s'est faite en condition acide avec l'acide formique (pour empêcher l'oxydation) ; 2) des produits de dégradation de l'anthocyane pourraient être co-élus en même temps sans être colorés (donc non visibles sur les profils).

B. Obtention de composés pour l'étude de l'influence du pH et de la co-pigmentation

1. Repurification de l'anthocyane

Après purification sur SEP-PAK de 94 mg d'idéaïne purifiée, nous avons récupéré **89.19 mg** d'idéaïne repurifiée. Nous avons revérifié le pourcentage de pureté de l'idéaïne repurifiée, et paradoxalement, il s'est avéré encore plus faible que celui avant purification (50%). Pour s'affranchir d'éventuelles interférences sur les tests de co-pigmentation à cause de contaminants inconnus, l'achat de poudre commerciale a été nécessaire, et a permis de réaliser les tests de co-pigmentations de façon fiable.

2. Obtention de flavan-3-ols

L'extrait de flavan-3-ols a été obtenu à l'aide de deux techniques de purification successives.

La première technique de pH-ZRCPC (« pH-zone-refining ») permet d'obtenir un fractionnement des acides hydroxycinnamiques avec les autres classes de composés. Le graphe de la pH-ZRCPC (Figure 8) montre un fort signal d'absorption à 320 nm entre 50 et 100 minutes, correspondant au maximum d'absorption des acides hydroxycinnamiques. L'analyse des fractions correspondantes confirme bien la présence de cette classe de polyphénols uniquement, qui peuvent donc bien être éliminés. A partir de 115 minutes l'extrusion commence. Elle correspond à une inversion des phases mobile et stationnaire, permettant d'éluer les composés les plus hydrophobes et de réduire les temps d'élution. Nous observons une zone de 128 à 164 minutes avec des pics co-élus montrant une forte absorbance à 280 nm. L'analyse des fractions en HPLC-UV-MS confirme la présence des flavan-3-ols, ainsi que de flavonols et de dihydrochalcones. Les fractions correspondantes à cette zone ont donc été poolées pour obtenir une fraction intermédiaire.

Une étape ultime de purification par HPLC préparative a été réalisée sur cet extrait intermédiaire. Un gradient en ACN optimisé a permis d'éluer tout d'abord les flavan-3-ols d'intérêt (polaires), puis les autres classes de polyphénols indésirables moins polaires (flavonols et dihydrochalcones) (Figure 9). L'absence d'acides hydroxycinnamiques a été confirmée par l'absence de signal à 320 nm, et par les analyses de fractions. Finalement, les fractions éluées entre 6.5 et 22.2 minutes, et correspondant aux flavan-3-ols, ont été poolées. La composition de l'extrait final a été vérifiée et a pu être utilisé pour tester les flavan-3-ols en tant que co-pigments potentiels.

C. Influence du pH sur la couleur

1. Analyse des spectres de l'idéaïne en UV-visible à différents pH et modélisation

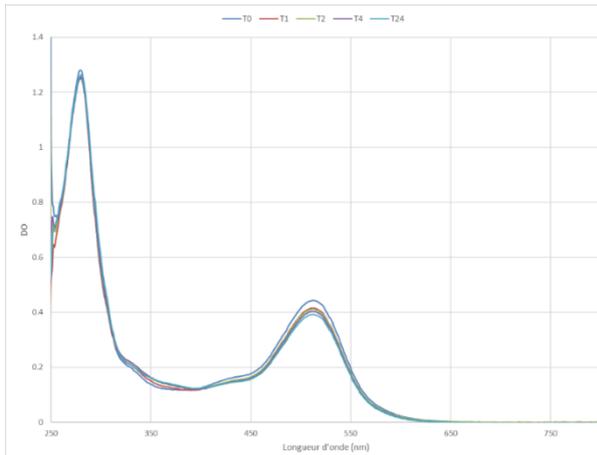


Figure 10 : Cinétique des spectres UV-Visible (en cuvette) de l'idaïne à pH 3.6 à différents temps (T en heures).

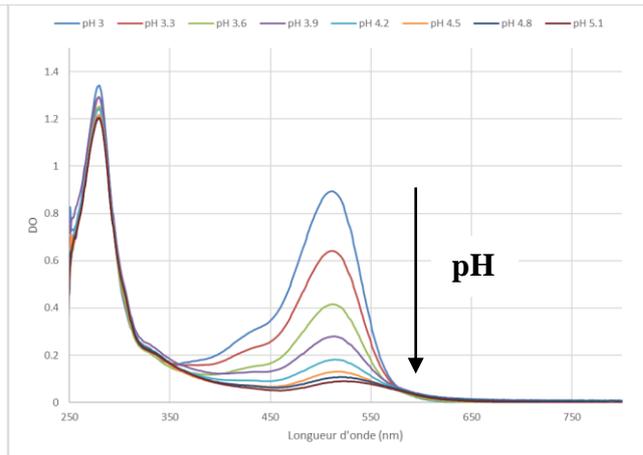


Figure 11 : Spectres UV-Visible (en cuvette) de l'idaïne à différents pH, à T = 1 heure.

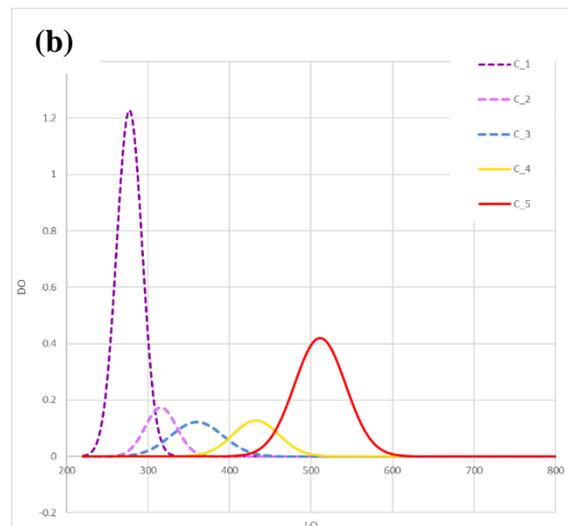
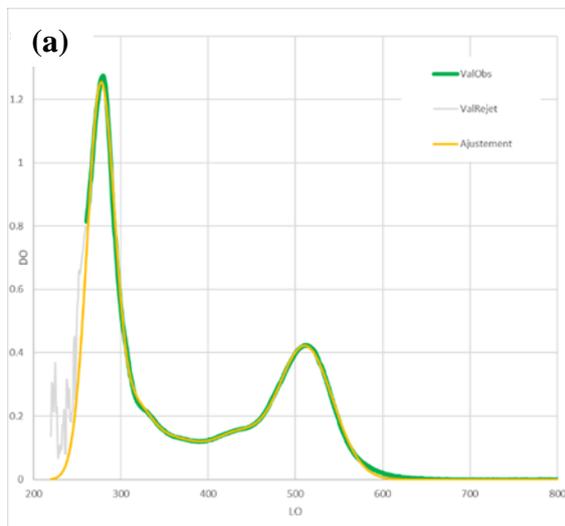


Figure 12 : (a) Courbe des valeurs de DO de l'idaïne observées (verte) et courbe d'ajustement théorique (jaune) en fonction de la longueur d'onde à pH 3.6 (T1h) ; (b) Gaussiennes représentant la déconvolution de la courbe des valeurs de DO observées en fonction de la longueur d'onde à pH 3.6 (T1h).

Dans un premier temps, nous avons réalisé des cinétiques de mesure des spectres de l'idéaïne à différents temps de stabilisation afin d'étudier la stabilité de l'anthocyane en solution. Nous avons choisi de ne montrer que les résultats de cinétique à pH 3.6, pour répondre aux conditions jus de pomme (les données aux autres pH ne sont donc pas montrées ici bien que leurs cinétiques aient été réalisées).

Sur la Figure 10, à pH 3.6, nous observons une diminution de la DO à 520 nm au fil du temps, avec une différence de DO assez importante entre T0 et T24.

Cependant entre T1, T2 et T4 les différences de DO sont minimales. Dans les 4 premières heures qui suivent la préparation à pH 3.6 la DO n'évolue pas de manière significative. A T24 la DO est plus faible mais on ne peut écarter une potentielle oxydation (les solutions n'ayant pas été conservées à l'abri de l'oxygène ni de la lumière). T1 a donc été retenu pour les autres résultats car la solution semble déjà se stabiliser au bout d'une heure.

Sur la Figure 11, les spectres de l'idéaïne à T1 sont montrés, cette fois-ci à différents pH. On voit très nettement une chute de la DO au lambda max du visible (520 nm) à mesure que le pH augmente, passant de 0.9 à pH 3 à 0.1 à pH 5.1. La diminution est brutale pour les pH les plus acides (entre 3 et 4.2, pH des jus de pomme) et se stabilise aux alentours de 4.5 et 4.8. Il semble également y avoir un léger décalage spectral de la DO maximale lorsque le pH augmente. En effet, le lambda max à pH est de 513 nm, celui à 5,1 à 532 nm. Le lambda max moyen de l'idéaïne dans les jus de pomme rosés étant 520 nm (pour un pH aux alentours de 3.5). De plus, on observe également une légère baisse de la DO à 280 nm lorsque que le pH augmente.

Les données obtenues ont été copiées dans une feuille Excel dans laquelle une modélisation a été réalisée. Le but est de déconvoluer les spectres par une courbe théorique dont les paramètres seront ensuite portés en fonction du pH. Une déconvolution de la courbe en cinq gaussiennes a été réalisée. Les gaussiennes ont été définies par une formule intégrée dans Excel, chaque gaussienne étant une fonction à courbe symétrique de formule : $Y = A \cdot \exp\left(-0,5 \left(\frac{x-M}{K}\right)^2\right)$.

La somme de ces cinq gaussiennes donne une courbe théorique. Chaque gaussienne est représentée par trois coefficients qui sont les suivants : K le coefficient de dispersion ; A la hauteur du pic ; et M le point d'abscisse correspondant à la plus haute valeur de DO (point central). L'ajustement de tous les paramètres de la courbe théorique a été réalisé grâce à la fonction Solver d'Excel qui minimise la somme des carrés des écarts entre les valeurs théoriques et réelles.

La Figure 12 (a) représente la courbe d'ajustement (en jaune), réalisée à partir de la courbe des valeurs expérimentales (en vert). On constate un bon ajustement entre les deux courbes, avec tout de même de petites différences notamment entre 550 et 600 nm où la courbe d'ajustement montre des valeurs de DO plus faibles. Les valeurs de DO expérimentales à des longueurs d'onde inférieures à 250 nm n'ont pas été prises en compte à cause du bruit de fond important. Cette courbe d'ajustement a été obtenue après déconvolution de la courbe des valeurs observées en cinq gaussiennes (numérotées de 1 à 5, que l'on observe sur la Figure 12 (b)). La gaussienne 1 en violet correspond au pic à 280 nm et la gaussienne 5 en rouge à celui à 520 nm. Les trois autres gaussiennes (2, 3 et 4) correspondent aux épaulements observés entre 300 et 450 nm. L'évolution des différents coefficients correspondant aux 5 gaussienne (A, M et K) en fonction du pH a été étudiée.

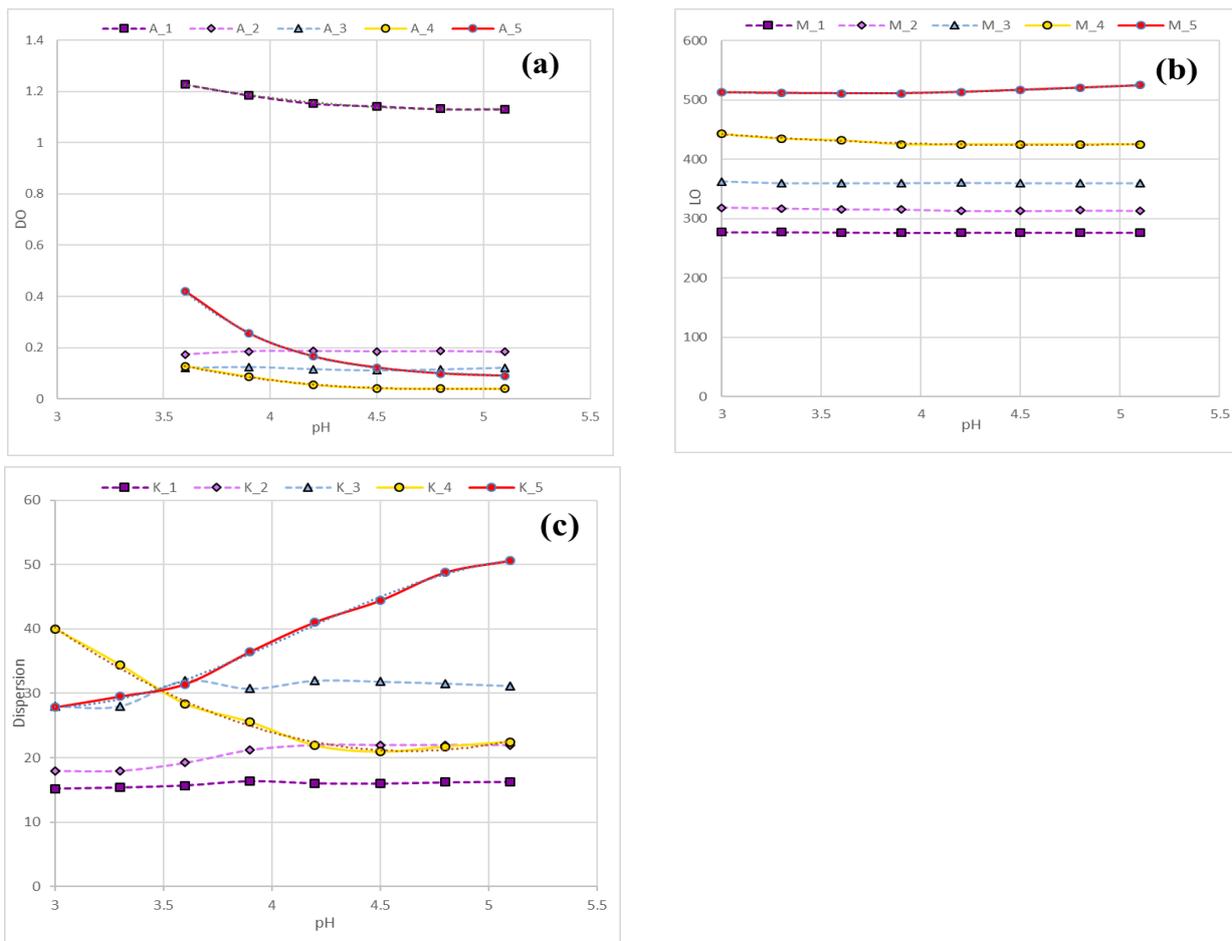


Figure 13 : Graphes de l'évolution (a) du coefficient A en DO, (b) du point central M en LO et (c) du paramètre de dispersion K, en fonction du pH.

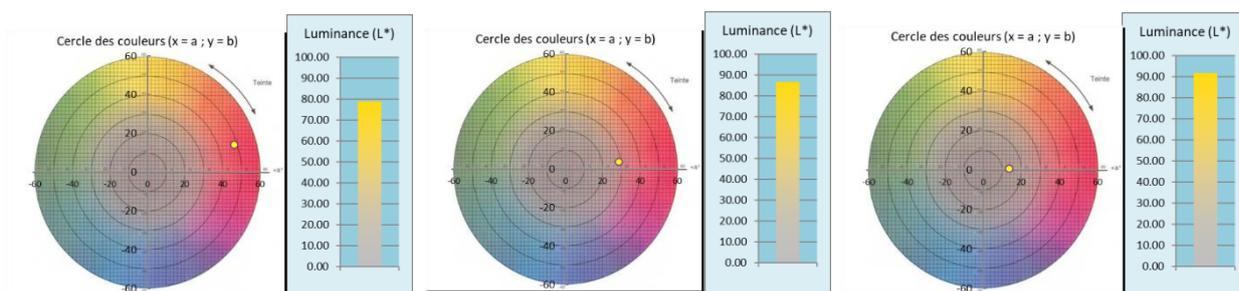


Figure 14 : Cercles de couleurs $L^*a^*b^*$ de l'idéine pour chaque pH et pourcentage de luminance (pH 3, 3.6 et 4.2 de gauche à droite).

La Figure 13 (a) représente l'évolution du paramètre A (correspondant à la hauteur du pic). Nous avons donc les valeurs de hauteur des pics (en DO) en fonction du pH. Pour les gaussiennes 2 et 3, A ne varie pas en fonction du pH. Concernant la gaussienne 1 (avec DO max à 280 nm), A diminue significativement lorsque le pH augmente mais le pourcentage de baisse reste faible. Pour la gaussienne 5 (DO max à 520 nm), A diminue fortement lorsque le pH augmente, surtout entre pH 3.6 et 4.5. Pour la gaussienne 4 la diminution semble faible du fait de la faible valeur absolue de ce paramètre mais le taux de baisse est voisin de celui du pic 5 : A4 et A5 présentent donc une évolution semblable avec le pH.

La Figure 13 (b) montre l'évolution du paramètre M, c'est-à-dire la longueur d'onde à la hauteur maximale du pic, en fonction du pH. Pour les gaussiennes 1, 2 et 3, M ne varie pas en fonction du pH, leur longueur d'onde maximale reste stable. M reste stable jusqu'à pH 4.2 pour la gaussienne 5, puis augmente légèrement : à partir de pH 4.2 on observe un léger décalage du pic vers de plus grandes longueurs d'onde.

La Figure 13 (c) représente l'évolution de la dispersion K en fonction du pH. Ce paramètre est difficile à analyser, car il a été contraint pour éviter une dérive de l'ajustement. Des limites minimale et maximale de dispersion ont donc été ajoutées, pour éviter l'étalement et donc le chevauchement des courbes. Le but étant de pouvoir se servir de ces courbes pour la prédiction et non pas de les expliquer précisément mathématiquement. K ne varie pas en fonction du pH pour les gaussiennes 1, 2 et 3 alors que pour la gaussienne 5 il varie énormément. Plus le pH augmente, plus la dispersion du pic est grande (pic à 520 nm plus étalé). A l'inverse, le K correspondant à la gaussienne 4, évolue dans l'autre sens. La dispersion diminue fortement à mesure que le pH augmente.

2. Analyse de la couleur en $L^*a^*b^*$

Comme observé sur la Figure 11, après stabilisation de l'idéaine ($T = 1$ heure), la DO à 520 nm diminue fortement à mesure que le pH augmente. En effet, la DO passe de 0.9 à pH 3 ; à 0.4 à pH 3.6 ; pour encore baisser jusqu'à moins de 0.2 à pH 4.2. La couleur change donc en fonction du pH, avec une intensité qui décline quand le pH augmente. Les paramètres de la couleur ont été calculés dans le système $L^*a^*b^*$ pour chacun des 3 spectres à pH 3, 3.6 et 4.2 (Figure 14). A pH 3, la couleur est éloignée du centre du cercle, ancré dans le rouge avec une valeur de a^* positive et grande (50), et une valeur de b^* positive également mais faible (15), ce qui indique que la couleur tend plus vers le jaune que le bleu. La luminance est de 80%. A pH 3.6, pH se rapprochant le plus de celui d'un jus de pomme classique, la couleur est plus rapprochée du centre du cercle, avec un angle de teinte plus petit. Les valeurs de a^* et b^* diminuent, et sont respectivement de 30 et 5, ce qui indique une baisse de la couleur rouge essentiellement. La luminance elle, augmente comparé à pH 3, et passe à 85%. A pH 4.2, la couleur est encore plus rapprochée du centre avec un a^* de 12 et un b^* de 0. La couleur est de moins en moins saturée, l'angle de teinte étant de 0. La valeur de L^* est de 90%, la luminance augmente donc quand le pH augmente.

Les paramètres $L^*a^*b^*$ théoriques, provenant de la courbe théorique réalisée par la modélisation expliquée ci-dessus, ont été calculés pour être comparés à ceux observés au même pH. Un graphe des valeurs théoriques de a^* et b^* , appelées valeurs modèles, en fonction des valeurs de a^* et b^* observées est présenté en Figure 15 (a). On observe deux droites passant par 0 correspondant donc à des fonctions linéaires d'équation $y = ax$ dont les pentes sont respectivement de 1.02 et 1.12 pour a^* (en rouge) et b^* (en jaune). Les valeurs modèles de a^* et b^* sont donc

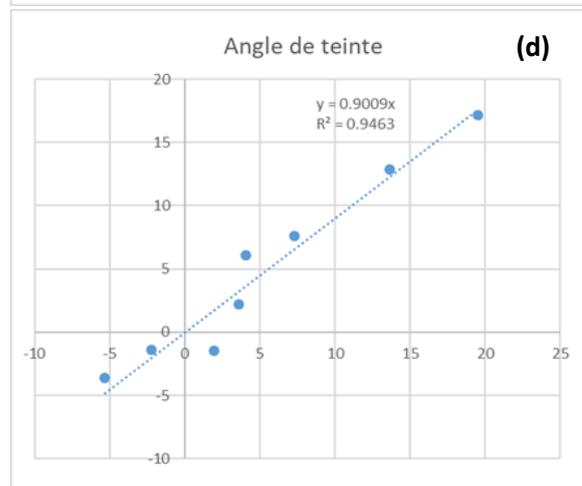
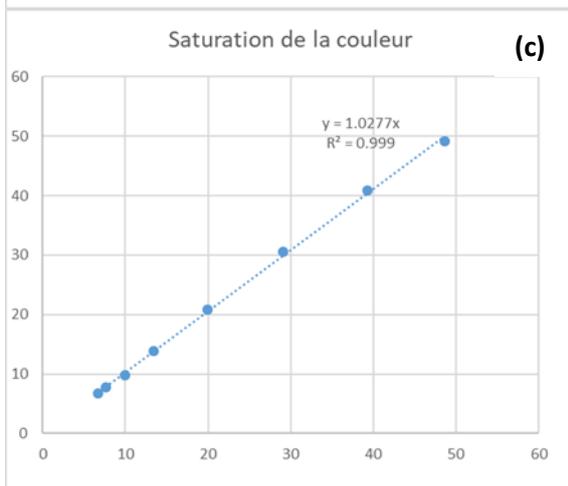
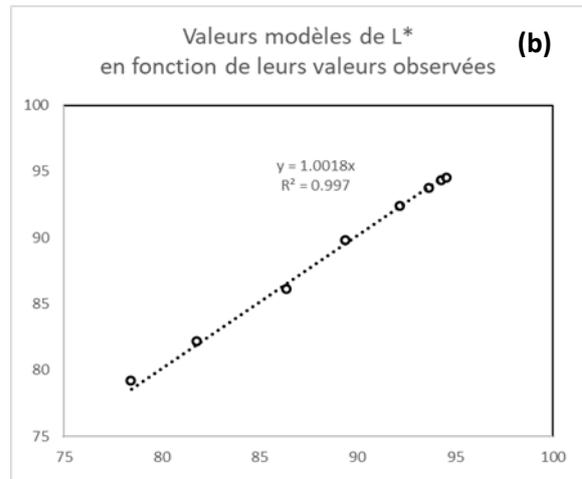
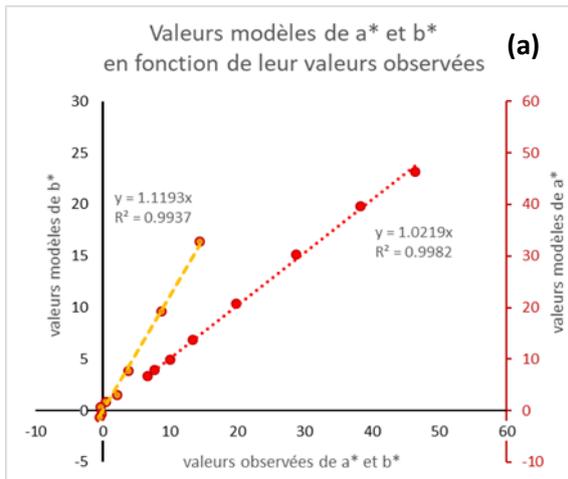


Figure 15 : Comparaisons des paramètres modèles avec ceux observés (a) a^* et b^* , (b) L^* , (c) C^* et (d) h° .

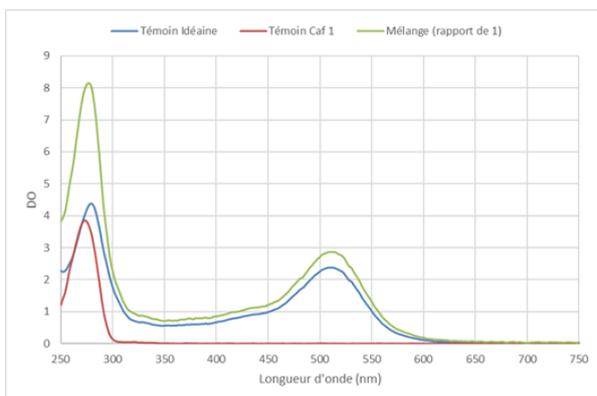


Figure 16 : Comparaison des spectres UV-visible de l'idéaïne seule (bleu), de la caféine seule (rouge) et du mélange idéaïne/caféine (vert). Ratio molaire caféine/idéaïne de 1.

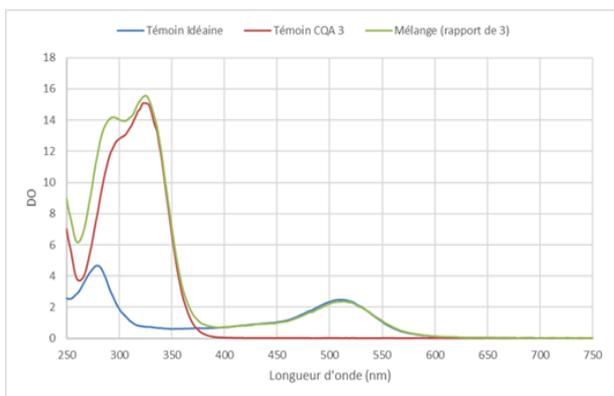


Figure 17 : Comparaison des spectres UV-visible de l'idéaïne seule, de l'acide chlorogénique seul et du mélange idéaïne/acide chlorogénique. Ratio molaire CQA/idéaïne de 3.

quasi identiques aux valeurs observées. Dans la Figure 15 (b), ce sont les valeurs modèles de L^* en fonction des valeurs observées de L^* qui sont représentées. Comme pour a^* et b^* , la droite est linéaire, passant par 0, avec une pente de 1. Les valeurs de L^* modèles sont donc très proches des valeurs de L^* expérimentales. Dans la Figure 15 (c), les saturations modèles et observées ont aussi été comparées. Le graphe représente aussi une fonction linéaire passant par 0 avec une pente de 1.03, avec des saturations modèles qui se rapprochent de celles observées. En ce qui concerne l'angle de teinte (Figure 15 (d)), la droite a pour équation $y=0.90x$ et un R^2 de 0.96 : la régression est nettement plus bruitée au niveau des points proches du centre, l'angle de teinte étant alors mal défini. Les valeurs d'angle faible représentent les pH les plus grands. On observe une diminution régulière de l'angle de teinte modèle quand le pH augmente.

D. Etude des effets de la co-pigmentation sur la couleur

1. Analyse des spectres de l'idéaïne en UV-visible avec des co-pigments connus

Quatre molécules reconnues comme co-pigments potentiels ont été choisies pour réaliser des tests de co-pigmentation avec l'idéaïne commerciale. Préalablement, comme pour l'anthocyane, les coefficients de réponses des co-pigments, qui n'avaient pas été déterminés jusqu'à présent par le laboratoire, ont été déterminés afin de pouvoir déterminer réellement les concentrations des solutions, et préparer des mélanges avec des ratios molaire co-pigments/idéaïne contrôlés. Les gammes et quantifications sont reportées en annexe 1.

a) A pH 3.5

Les tests de co-pigmentation ont été réalisés avec de l'idéaïne commerciale à 120 mg/L théorique en solution dans du tampon malate 20 mM pH 3.5. Une quantification des solutions pour connaître leur concentration exacte a permis de déterminer les rapports molaires anthocyane/co-pigment. Les ratios choisis ont été de 1, 1.5 et 2 pour la caféine, l'acide *p*-coumarique et l'acide caféique ; et de 1, 2 et 3 pour l'acide chlorogénique, présent en plus grande quantité dans les jus de pomme. Les mesures ont été prises 30 minutes après l'obtention des mélanges, temps au bout duquel les mélanges se stabilisent (démontré au préalable dans une expérimentation de cinétique).

(1) Avec la caféine

D'après la Figure 16, dans la zone UV, on observe bien une augmentation de la DO au lambda max de la caféine (280 nm). Dans la zone visible (qui nous intéresse pour la copigmentation), il y a un léger phénomène de co-pigmentation : à 520 nm la DO du mélange est plus forte que l'idéaïne seule à même concentration (plus visible pour le rapport de 1 que de 2). Cependant, il n'y a pas de décalage spectral, que ce soit dans l'UV ou le visible.

(2) Avec l'acide chlorogénique (acide caféoylquinique)

D'après la Figure 17, dans la zone UV, on observe une augmentation de la DO, du au lambda max de l'acide chlorogénique (320 nm) ainsi que deux pics pour le mélange (280 nm correspondant à l'idéaïne et 320 nm correspondant à l'acide chlorogénique). Pour le mélange au niveau du visible, on n'observe pas de différence significative avec le spectre de l'idéaïne seule.

(3) Avec l'acide *p*-coumarique

D'après la Figure 18, dans la zone UV, on observe bien une augmentation de la DO au lambda max de l'acide *p*-coumarique (320 nm) ainsi que deux pics pour le mélange (280 nm

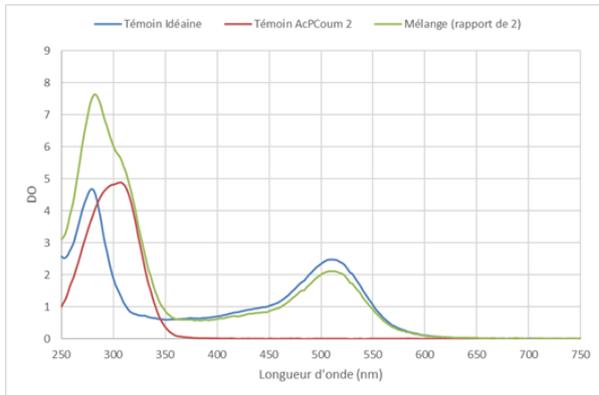


Figure 18 : Comparaison des spectres UV-visible de l'idéaïne seule, de l'acide p-coumarique seul et du mélange idéaïne/acide p-coumarique. Ratio molaire acide p-coumarique/idéaïne de 2

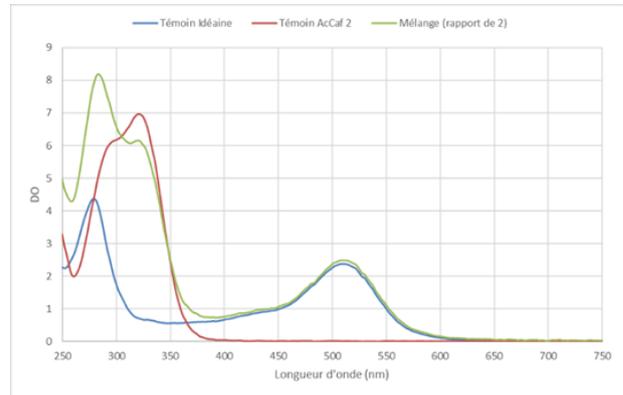


Figure 19 : Comparaison des spectres UV-visible de l'idéaïne seule, de l'acide caféique seul et du mélange idéaïne/acide caféique. Ratio molaire de 2.

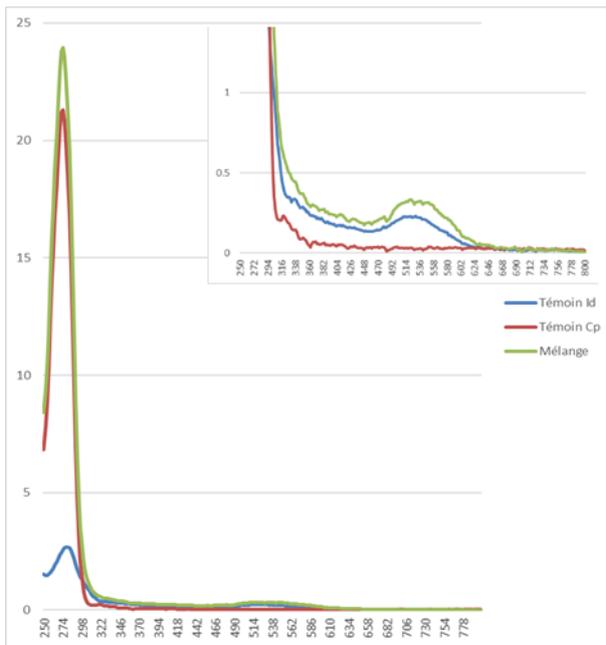


Figure 20 : Spectres UV-Visible à pH 5.1 de l'idéaïne (bleu), de la caféine (rouge) et du mélange idéaïne/caféine avec un rapport molaire caféine/idéaïne de 10 (vert). Avec zoom sur la zone du visible.

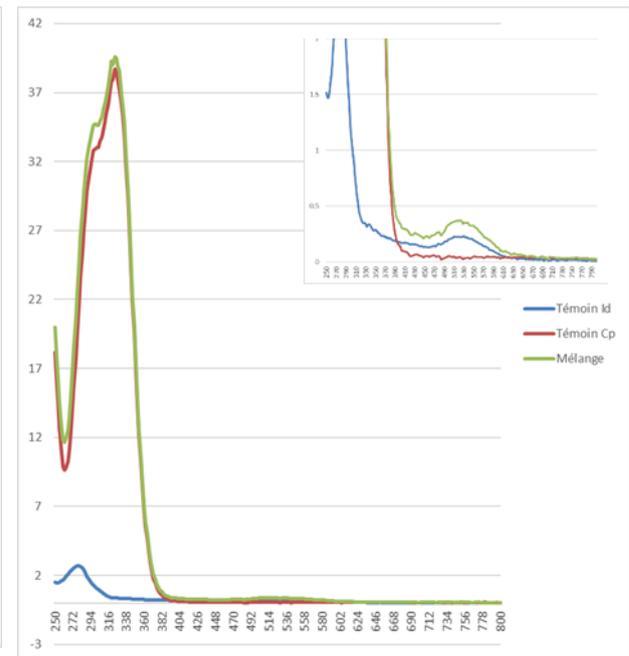


Figure 21 : Spectres UV-Visible à pH 5.1 de l'idéaïne (bleu), de l'acide chlorogénique (rouge) et du mélange idéaïne/acide chlorogénique avec un rapport molaire CQA/idéaïne de 10 (vert). Avec zoom sur la zone du visible.

correspondant à l'idéaïne et 320 nm correspondant à l'acide p-coumarique) mais la DO du mélange dans l'UV ne correspond pas à l'addition des DO du co-pigment et de l'idéaïne seule. Pour le mélange au niveau du visible, la DO de l'idéaïne seule est plus grande que celle du mélange ce qui est en contradiction avec l'hypothèse d'une co-pigmentation.

(4) Avec l'acide caféique

D'après la Figure 19, dans la zone UV, on observe bien une augmentation de la DO au lambda max de l'acide caféique (320 nm) ainsi que deux pics pour le mélange (280 nm correspondant à l'idéaïne et 320 nm correspondant à l'acide caféique). Pour le mélange au niveau du visible, à l'inverse de celui avec la caféine, la DO de l'idéaïne seule est légèrement plus grande que celle du mélange dans cette région.

L'effet de co-pigmentation n'a pas été démontré à pH 3.5. IL n'y a ni augmentation de l'intensité de l'absorbance dans le visible, ni de décalages spectraux vers la droite (hypsochrome) ou vers la gauche (bathochrome), qui pourraient être observés dans le cas de co-pigmentation. Le fait que la DO à 520 nm de l'idéaïne soit parfois plus élevée que celle du mélange fait douter de l'efficacité de notre procédure pour observer la co-pigmentation.

b) *A pH 5.1 :*

De façon à essayer de mettre en évidence un effet de co-pigmentation, nous avons réalisé des mélanges à un pH plus élevé, même si nous nous écartions des conditions « jus de pomme ». Les mêmes tests de co-pigmentation que précédemment ont donc été réalisés, mais seulement avec deux co-pigments, la caféine (pour une référence connue) et l'acide chlorogénique (pour un composé majoritaire dans les jus), avec des ratio molaires co-pigments/idéaïne plus importants (ratio de 10).

(1) Avec la caféine

D'après la Figure 20, dans la zone UV, le pic UV à 280 nm du mélange est bien la somme de celui de l'anthocyane seule et de celui du co-pigment seul. Dans la zone visible, le pic à 520 nm du mélange est légèrement plus grand que celui de l'idéaïne seule, mais dans les deux cas les DO sont très faibles (idéaïne peu colorée à pH 5,1). Si un phénomène de co-pigmentation existe à des pH plus élevés, l'augmentation de DO reste faible (d'environ 0,15).

(2) Avec l'acide chlorogénique

D'après la Figure 21, comme pour la caféine, dans la zone du visible le pic à 520 nm du mélange est plus grand que celui de l'idéaïne seule, bien que les deux restent très faibles. Un phénomène de co-pigmentation ne peut être écarté mais l'augmentation de DO est faible (d'environ 0,15 aussi).

En conclusion, l'effet co-pigmentation a bien été mis en évidence à pH 5.1. Un effet hyperchrome, c'est-à-dire une augmentation de l'intensité de la DO au lambda max de l'anthocyane, est présent, mais assez faiblement. De plus, il semble y avoir un léger effet bathochrome, un décalage spectral vers de plus grande longueur d'onde, ce qui corrèle avec l'augmentation de la couleur rouge du mélange.

2. Tests de co-pigmentation avec les flavan-3-ols

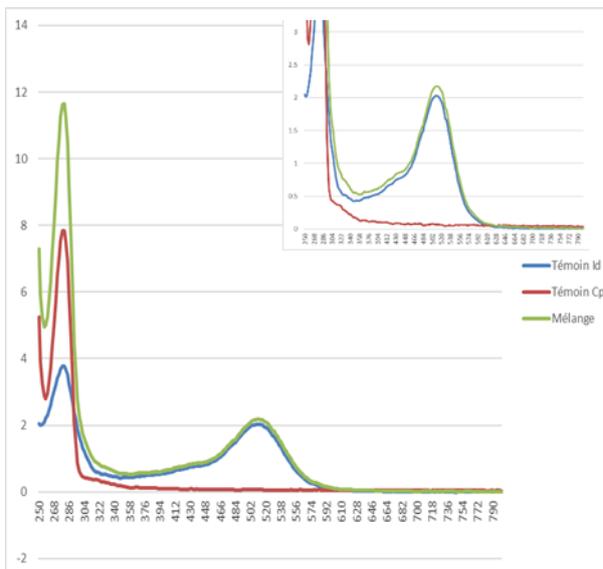


Figure 22 : Spectres UV-Visible à pH 3.5 mesurés en LVis de l'idéaïne seule (bleu), des tanins seuls (rouge), et du mélange idéaïne/flavan-3-ols (vert). Avec zoom sur la zone du visible.

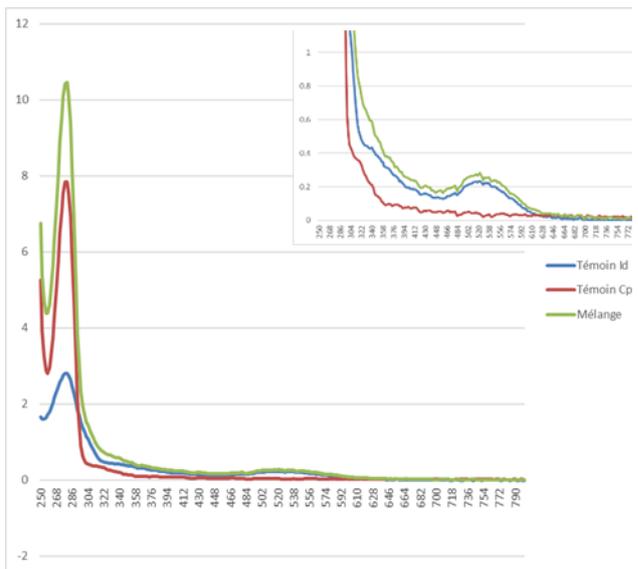


Figure 23 : Spectres UV-Visible mesurés à pH 5.1 en LVis de l'idéaïne seule (bleu), des tanins seuls (rouge), et du mélange idéaïne/flavan-3-ols (vert). Avec zoom sur la zone du visible.

Des tests de co-pigmentation entre l'idéaïne et un extrait de flavan-3-ols (obtenu par CPC et HPLC préparative en amont) ont été réalisés à pH 3.5 et 5.1 (pH plus élevé qui a précédemment mis en évidence une petite co-pigmentation entre cet anthocyane et les co-pigments testés).

a) A pH 3.5 :

D'après la Figure 22, dans la zone UV, on constate que la somme des DO de l'idéaïne seule et des tanins seuls correspond bien à la DO du mélange à 280 nm (longueur d'onde d'absorption maximale des tanins et de l'anthocyane). Dans la zone du visible, la DO du mélange est légèrement supérieure à celle de l'idéaïne seule, avec une différence de 0.2 à 520 nm.

b) A pH 5.1 :

D'après la Figure 23, dans la zone UV, comme à pH 3.5 la somme des DO de l'idéaïne seule et des tanins seuls correspond bien à la DO du mélange à 280 nm. Dans la zone du visible, la DO du mélange est aussi légèrement supérieure à celle de l'idéaïne seule, avec toujours une différence de 0.2 à 520 nm.

Ces résultats indiquent un effet de co-pigmentation entre les polyphénols de la famille des flavan-3-ols et l'idéaïne, même si l'effet reste minime. De plus, il semblerait que la variation de pH donne des résultats de co-pigmentation similaires dans le cas des flavan-3-ols.

IV. Discussion

A. Influence du pH sur la couleur

L'influence du pH sur la couleur a été testé sur une gamme de pH restreinte correspondant au milieu jus de pomme. Préalablement, nous avons réalisé des mesures de spectres sur 24 heures, en utilisant une solution d'idéaïne à un pH qui correspondait au pH moyen d'un jus de pomme (3.6), afin de pouvoir définir le temps à partir duquel nous pourrions acquérir les spectres des solutions aux différents pH, pour l'étude en question. Les résultats ont montré que la stabilisation des solutions était très rapide. Nous nous sommes donc fixés un temps de 1 heure à partir duquel nous pouvions mesurer les différents spectres. Les résultats montrent qu'il y a une perte de couleur au fil du temps. La diminution de la DO dans le visible, donc de la couleur, est conséquente entre 0 et 24 heures. Les phénomènes d'oxydation du milieu pourraient être la cause de cette baisse significative, les anthocyanes étant connues pour subir des effets d'oxydation sur le long terme, et cette oxydation a des répercussions sur la couleur (brunissement, perte d'intensité de couleur, etc) (Février *et al.*, 2017).

Les résultats obtenus confirment un effet bien connu chez les anthocyanes : l'intensité colorante diminue lorsque le pH augmente. Plus le pH est important plus la DO au maximum d'absorption dans le visible diminue. Pour rendre compte quantitativement de cet effet du pH sur l'anthocyane, ou plutôt sur les formes de l'anthocyane, une déconvolution de la courbe des valeurs de DO observées en plusieurs gaussiennes ayant chacune plusieurs paramètres (hauteur, point central et dispersion) a été effectuée. On peut supposer que les cinq gaussiennes sont associées à diverses fonctions chimiques présentes sur la molécule d'anthocyane et que l'évolution de la molécule en ses différentes formes en fonction du pH conduit à une modification des pics d'absorbance. La première gaussienne (1) représentant le pic à 280 nm, a des paramètres de dispersion et de point central qui varient peu en fonction du pH, et une hauteur de pic diminuant légèrement à des pH plus élevés. En réalité, l'absorption dans l'UV de l'anthocyane dépend très peu du pH, cette courbe résultant simplement de l'absorption dans l'UV par l'une des structures en équilibre de l'idéaïne, la forme hémiacétale incolore, qui possède un noyau ortho-diphénol. La dernière gaussienne (5), représentant le pic aux alentours de 520 nm, est celle qui varie le plus avec le pH. La hauteur du pic diminue fortement à mesure que le pH augmente et est même très faible pour des pH de 4.5 à 5 et plus. L'étalement du pic est d'autant plus important quand le pH augmente, et la longueur d'onde maximale d'absorption est légèrement décalée vers la droite ce qui indique un léger effet bathochrome. On peut conclure que cette courbe est reliée au squelette de la forme cation flavylium de l'anthocyane, forme colorée prédominante aux pH acides et qui existent également aux pH jus de pomme, donnant sa couleur rouge. Les autres gaussiennes (2 et 3) responsables de l'épaulement visible entre les deux pics principaux, représentent d'autres parties des différentes formes moléculaires de l'anthocyane, qui sont stables vis-à-vis du changement de pH et ne contribuent pas beaucoup à la couleur : on voit que les courbes 2 et 3 absorbent essentiellement dans l'UV (et légèrement dans le violet), et ont des paramètres ne variant pratiquement pas avec le pH. En revanche, la courbe 4 présente aux alentours des 400-500 nm présente une hauteur de pic variable en fonction du pH ; un pic plutôt étalé à pH très acide ; et un pic plus fin quand le pH augmente. Cette dernière a également un pourcentage de diminution du pic en fonction du pH similaire à celui de la courbe 5 (à 520 nm). Le pic 4 serait alors lui aussi dû à la forme cation flavylium. Lorsque l'intensité de ces deux pics diminue, il y a une perte de couleur mais pas d'apparition de nouveaux pics dans le visible, ce qui suggère l'apparition de

formes dépourvues de chromophores donc non détectables en spectrophotométrie visible. Comme pour les autres anthocyanes connues, l'idéaïne existe sous plusieurs formes moléculaires dont l'équilibre varie selon le pH, bien que ce soit la forme cation flavylum qui contribue le plus à la couleur rouge exprimée aux pH jus de pomme.

B. Etude des effets de la co-pigmentation sur la couleur

Avant de réaliser les mélanges idéaïne/co-pigments potentiels pour étudier la co-pigmentation, beaucoup de travail en amont a été réalisé : détermination des coefficients de réponse des molécules testées quand ceux-ci n'avaient pas été déterminés préalablement par l'équipe (idéaïne, acide caféique, acide *p*-coumarique), repurification de l'anthocyane purifiée ; et enfin un travail conséquent pour obtenir des flavan-3-ols, en CPC et HPLC préparative représentant 2 à 3 semaines.

Les tests de co-pigmentation entre l'idéaïne et quatre co-pigments connus (caféine, acide chlorogénique, acide *p*-coumarique et acide caféique) à pH jus de pomme (3.5) n'ont pas été concluants. En cas de fort effet de co-pigmentation, le résultat attendu aurait été un net effet hyperchrome dans la zone du visible, notamment à 520 nm, lambda max de l'anthocyane qui lui vaut sa couleur rouge, ou un effet bathochrome / hypsochrome venant modifier qualitativement le spectre (Rein, M., 2005). Or, les mesures des spectres des mélanges anthocyane/co-pigments à pH 3.5 ne permettent pas de montrer une hausse significative de la DO ni de décalages spectraux, qui indiqueraient une co-pigmentation (Mendoza *et al.*, 2019). La seule molécule testée pour laquelle on peut supposer un faible effet de co-pigmentation est la caféine, co-pigment connu nous ayant servi de référence, mais non présent dans les jus de pomme. Cependant le fait que la DO à 520 nm de l'idéaïne soit parfois plus élevée que celle du mélange peut indiquer une imprécision liée à la procédure utilisée pour observer la co-pigmentation et empêche de conclure définitivement à l'absence de co-pigmentation.

Cette absence de co-pigmentation supposée avec les acides phénoliques testés, présents dans les jus de pomme, pourrait s'expliquer d'une part par les différentes formes de l'idéaïne. En effet, à pH acide (aux alentours de 3), la forme colorée prédominante est le cation flavylum. Comme son nom l'indique cette forme est chargée positivement, ce qui pourrait avoir un effet de répulsion (ou pas d'effet, effet neutre) plutôt que d'attraction avec les acides testés. En revanche à pH 5.1, il semble que de la co-pigmentation entre l'anthocyane et la caféine/l'acide chlorogénique présente un léger effet. A ce pH, l'équilibre entre les différentes formes de l'idéaïne évolue vers davantage de forme dite quinoïde, de couleur bleutée ou violacée, qui apparait suite à une déprotonation (Mendoza *et al.*, 2019). Cette forme non chargée favoriserait alors les liaisons avec la caféine, mais aussi avec l'acide chlorogénique, très présent dans les jus de pomme. Cependant, le pH des jus de pomme ne varie qu'entre 3 et 4, ce qui exclurait donc la co-pigmentation avec les acides phénoliques présents. D'un point de vue industriel, cette absence de co-pigmentation pourrait être un avantage. Compte tenu de la diversité chimique présente dans les jus, le risque de liaisons entre molécules est fort probable, et le fait d'avoir montré que la co-pigmentation était difficile aux pH des jus, serait un atout pour faciliter le travail de prédiction de la couleur. S'il y avait eu de la co-pigmentation, la couleur d'un mélange de différents jus en fonction du pH serait plus difficile à prédire, avec des risques d'incertitudes sur l'intensité de la couleur, ou même un changement de couleur (suivant la composition de ces jus).

Autres que les acides, de nombreux flavan-3-ols comprenant les tanins (oligomères de DP divers) et les monomères de catéchine sont aussi très présents dans les jus de pomme. Les tanins pouvant former des liaisons covalentes avec des anthocyanes dans le vin et former des tanins pigmentés (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). L'isolation et la purification de flavan-3-ols (constitués de tanins et de monomères de catéchines) à partir d'un extrait polyphénolique de jus de pomme contenant un mélange complexe des différentes classes de polyphénols a permis de réaliser des tests de co-pigmentation idéaïne/flavan-3-ols dans le cadre de ce stage. Les mélanges flavan-3-ols/idéaïne ont une DO légèrement plus élevée à 520 nm que l'anthocyane seul. La différence d'intensité est minime (0.2 de DO) mais non négligeable. Contrairement aux acides testés précédemment, le pH ne fait pas varier la co-pigmentation avec les flavan-3-ols. Les tests effectués à pH 3.5 et 5.1 donnent des résultats similaires, on en déduit que quelle que soit la forme prédominante de l'anthocyane, de la co-pigmentation avec les flavon-3-ols du milieu peut avoir lieu. Dans ce cas, la co-pigmentation tend à augmenter l'intensité de la couleur (effet hyperchrome visible) mais pas à la changer (pas de décalage spectral vers d'autres longueurs d'ondes). Ces résultats sont importants et intéressants pour les cidriers, car quel que soit le pH la présence de flavan-3-ols ne va pas changer la couleur, seulement l'intensifier. La prédiction de la couleur en fonction du pH est donc tout à fait possible. L'effet de co-pigmentation est cependant très faible et les réserves concernant l'imprécision de notre procédure rend nécessaire une confirmation de ces résultats.

V. Conclusion

L'objectif de ce stage était d'étudier deux paramètres agissant sur la couleur des jus de pomme rosés, autour de la molécule responsable de la couleur en question : l'idéaïne. Le pH et les effets de co-pigmentation ont donc été étudiés, en conditions jus de pomme (pH acide, 3.5) mais aussi dans d'autres conditions (pH plus grand, jusqu'à 5.1), en s'inspirant de la littérature sur les anthocyanes. Les résultats obtenus ont permis à l'équipe de montrer qu'il était possible, à court terme, de créer et d'optimiser un système de prédiction de la couleur d'un assemblage de différents jus (rosés ou non) en ayant les caractéristiques physicochimiques des différentes parties de cet assemblage.

Il a été démontré dans ce stage que le pH agit bien sur la couleur de l'anthocyane et donc des jus de pomme rosés. Connaître la modification du pH d'un jus permettrait alors de prédire la couleur du jus résultant. Les résultats montrent une baisse de la densité optique de l'anthocyane dans le visible, ce qui signifie une perte de couleur rouge, lorsque l'on augmente le pH. La forme colorée prédominante aux pH acides des jus reste la forme cation flavylum (rouge), qui disparaît aux profits d'autres formes incolores à pH plus élevé. Cette perte de couleur s'effectue dès que l'on passe à des pH aux environs de 4.5, pH auquel la couleur devient déjà très faible. Il est donc important de maintenir un pH aux alentours de 3.5 pour les jus de pomme rosés si l'on veut garder sa belle couleur. La création d'un modèle de prédiction des valeurs de densité optique de l'idéaïne en fonction du pH permettra à l'équipe de connaître la couleur de mélanges de jus dès lors que le pH peut être calculé.

Concernant la co-pigmentation, l'hypothèse de début de stage supposait la présence de co-pigmentation entre l'idéaïne et certains composés des jus de pomme (présents en grande quantité comme l'acide chlorogénique par exemple), et que l'effet de cette co-pigmentation aurait un impact sur la couleur, l'intensifiant (effet hyperchrome) et même la modifiant (effet bathochrome ou hypsochrome). Cependant, les résultats des tests de co-pigmentation à pH des jus de pomme (3.5) n'ont pas révélé d'effet de co-pigmentation significatif. Ces résultats sont d'un point de vue industriel intéressant pour les cidriers, qui n'ont pas à se soucier de la co-pigmentation lors de la fabrication de leur jus. En revanche à pH plus élevés, la co-pigmentation semble être favorisée, mais reste minime. La mesure en très faible chemin optique qui a été choisie pour des contraintes de quantités de substrats n'est peut-être pas la meilleure solution sur le plan de la précision des mesures. Néanmoins, il est possible de conclure que, si la co-pigmentation existe pour l'idéaïne, son effet reste limité et ne devrait pas apporter une forte modification de la couleur dans la pratique.

Les études sur le pH et la co-pigmentation avec l'idéaïne ont permis de mieux comprendre la stabilité de sa couleur. Cependant, de nombreux autres paramètres peuvent aussi entrer en jeu, aux vues de la diversité chimique dans les jus de pomme rosés, et doivent donc être approfondies.

Références bibliographiques

- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, *197*, 39-46.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, *113*(4), 859-871.
- Cruz, L., Basílio, N., & de Freitas, V. (2020). Color stabilization of cyanidin-3-glucoside-based dyes by encapsulation with biocompatible PEGylated phospholipid micelles. *Dyes and Pigments*, *181*, 108592.
- Dueñas, M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2006). Formation of anthocyanin–flavanol adducts in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 15-25.
- Février, H., Le Quéré, J. M., Le Bail, G., & Guyot, S. (2017). Polyphenol profile, PPO activity and pH variation in relation to colour changes in a series of red-fleshed apple juices. *LWT-Food Science and Technology*, *85*, 353-362.
- Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcão, L. D., & Bordignon-Luiz, M. T. (2007). Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry*, *100*(3), 1289-1296.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(4), 1740-1746.
- Le Deun, E. (2016). *Couleur des jus de pomme et des cidres: analyse structurale et impact de plusieurs paramètres physicochimiques* (Doctoral dissertation, Université de Rennes 1).
- Malec, M., Le Quéré, J. M., Sotin, H., Kolodziejczyk, K., Bauduin, R., & Guyot, S. (2014). Polyphenol profiling of a red-fleshed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(29), 6944-6954.
- Mendoza, J., Basílio, N., de Freitas, V., & Pina, F. (2019). New procedure to calculate all equilibrium constants in flavylium compounds: application to the copigmentation of anthocyanins. *ACS omega*, *4*(7), 12058-12070.
- Millet, M., Poupard, P., Guilois-Dubois, S., Zanchi, D., & Guyot, S. (2019). Self-aggregation of oxidized procyanidins contributes to the formation of heat-reversible haze in apple-based liqueur wine. *Food chemistry*, *276*, 797-805.
- Molaeafard, S., Jamei, R., & Marjani, A. P. (2021). Co-pigmentation of anthocyanins extracted from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) with some organic acids: Color intensity, thermal stability, and thermodynamic parameters. *Food Chemistry*, *339*, 128070.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.

Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical reviews*, 116(9), 4937-4982.

Zollinger, H. (2003). *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. John Wiley & Sons.

Références sitographiques

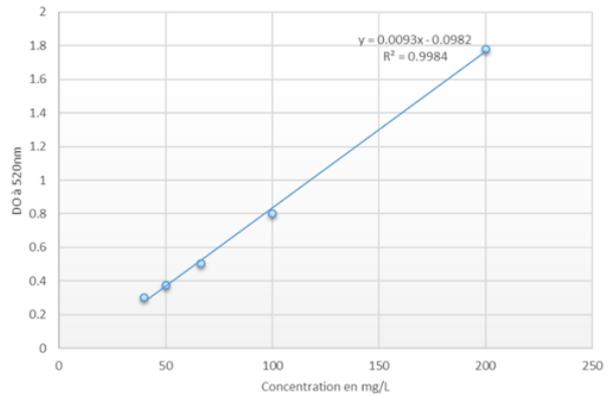
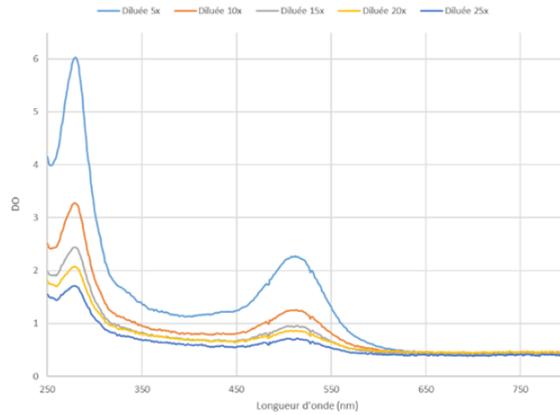
Unijus, les chiffres clés de la filière [en ligne]. Disponible sur : <https://www.unijus.org/1-514-economie-marche/532-les-chiffres-de-la-filiere.aspx>

PubChem [en ligne]. Disponible sur : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

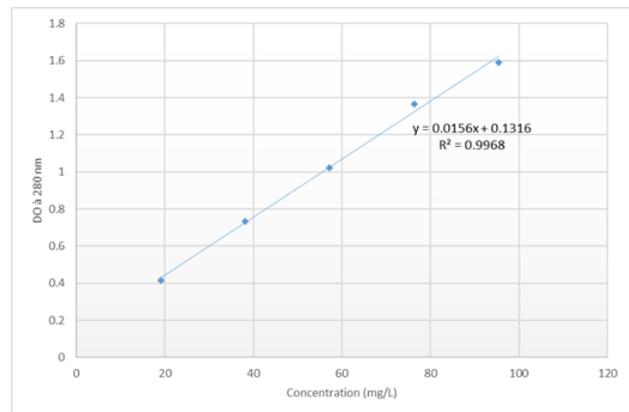
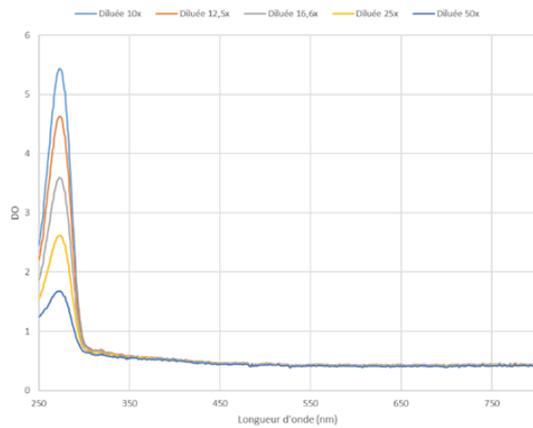
ANNEXES

Annexe 1 : Spectres obtenus en plaque LVis et gamme des composés après quantification en HPLC-UV-MS (concentrations réelles calculées grâce au coefficient de réponse de chaque composé). (a) Idéaïne (b) Caféine (c) Acide chlorogénique (d) Acide paracoumarique (e) Acide caféïque.

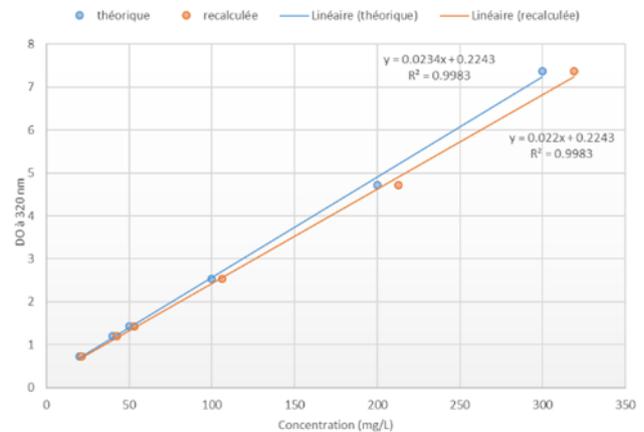
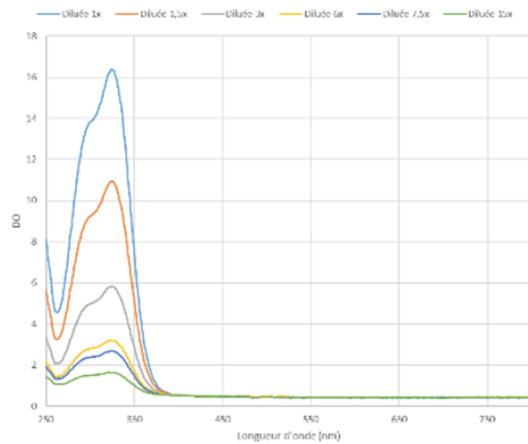
(a)



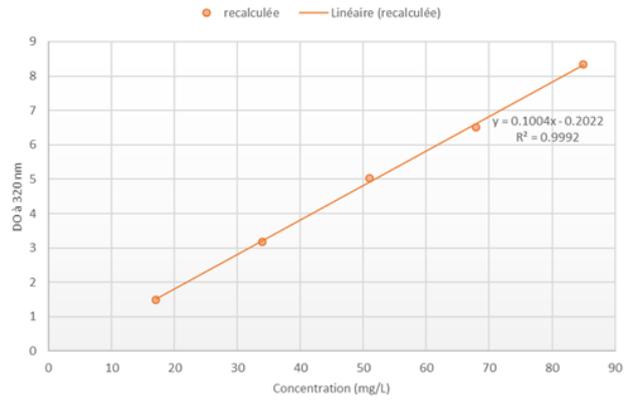
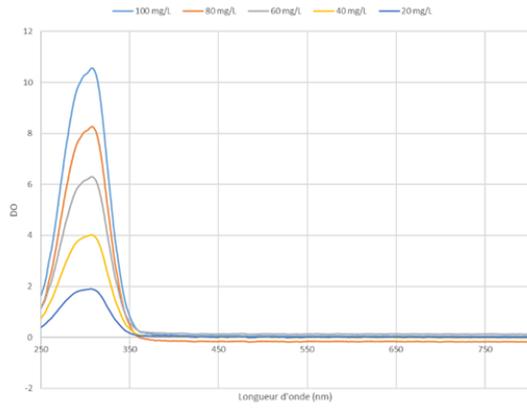
(b)



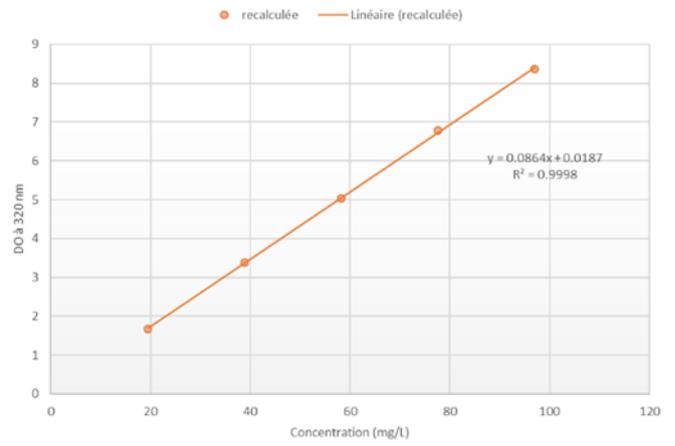
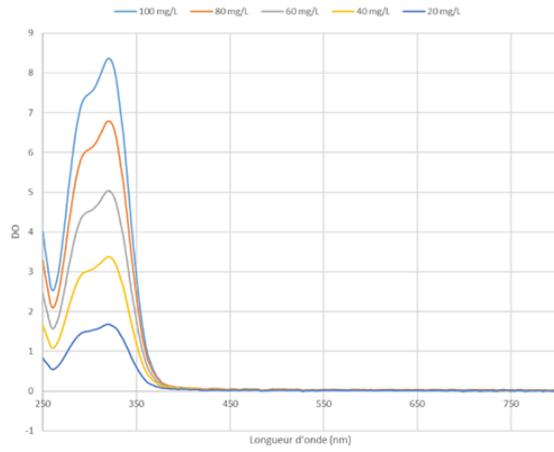
(c)



(d)



(e)



  	Diplôme et Mention : Master Biologie, Agrosiences Parcours : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal Option : Phytochimie Qualité et Valeurs d'Usage Responsable d'option : Alain Bouchereau
Auteur : Julie Thomas Date de naissance : 29/09/1998	Organisme d'accueil : INRAE Pays de la Loire, équipe PRP
Nb pages : 22 Annexe : 1	Adresse : Domaine de La Motte, 35650 Le Rheu
Année de soutenance : 2021	Maître de stage : Jean-Michel Le Queré, Sophie Guilois-Dubois
Titre français : Impact du pH et de la co-pigmentation sur la couleur des jus de pomme rosés. Titre anglais : Impact of pH and copigmentation on the color of rosé apple juices.	
Résumé : Le jus de pomme étant l'un des jus les plus consommés dans le monde, pour répondre à la demande croissante et aux tendances, les jus de pomme rosés (au même titre que les cidres rosés) ont vu le jour ces dernières années. Ces boissons à base de pomme à chair rouge se distinguent par leur couleur rosée, due à une anthocyane appelée idéaïne. Cette anthocyane est présente sous sa forme cation flavylium aux pH des jus de pomme (entre 3 et 4), forme qui lui confère cette couleur. L'étude porte donc sur les paramètres qui influencent la couleur de l'idéaïne. Deux paramètres principaux ont été étudiés : le pH et la co-pigmentation. Les hypothèses de travail étaient : qu'un pH élevé favoriserait la perte de l'intensité colorante ; et que de la co-pigmentation entre l'idéaïne et d'autres composés présents dans les jus aurait lieu, ce qui tendrait à renforcer la couleur rouge, voire à la modifier. Le but étant, au terme de ce stage, de construire un modèle de prédiction de la couleur d'un ou plusieurs jus, en fonction du pH résultant. Les mesures de spectres en UV-Visible à différents pH ont permis de valider notre hypothèse sur le comportement de l'idéaïne à différents pH ; mais aucun effet de co-pigmentation n'a été démontré entre l'anthocyane et les co-pigments potentiels testés à pH 3.5, sauf dans le cas des flavan-3-ols, où un effet hyperchrome minime a été identifié. En revanche, le modèle prédictif a pu être construit et semble fiable pour connaître la couleur d'un jus en fonction de son pH.	
Abstract : With apple juice being one of the most consumed juices in the world, to meet growing demand and trends, rosé apple juices (like rosé ciders) have emerged in recent years. These red-fleshed apple drinks are distinguished by their pink color, due to an anthocyanin called ideain. This anthocyanin is present in its flavylium cation form at the pH of apple juice (between 3 and 4), a form which gives it this color. The study focuses on the parameters that influence the color of the ideain. Two main parameters were studied : pH and copigmentation. The working hypotheses were : that a high pH would favor the loss of color intensity ; and that copigmentation between ideain and other compounds present in the juices would occur, which would tend to strengthen or even modify the color. The goal being, at the end of this internship, to build a prediction model of the color of one or more juices, depending on the resulting pH. Measurements of UV-Visible spectra at different pHs validated our hypothesis on the behavior of the ideain at different pH ; but no copigmentation effect was demonstrated between the anthocyanin and the potential copigments tested at pH 3.5, except in the case of flavan-3-ols, where a minimal hyperchromic effect was identified. However, the predictive model was able to be built and seems reliable to know the color of a juice according to its pH.	
Mots-clés : anthocyane, idéaïne, pH, co-pigmentation, système L*a*b*, effet hyperchrome Key Words : anthocyanin, idéain, pH, copigmentation, CIELAB, hyperchromic effect	