

BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

I/INTRODUCTION

De nombreuses denrées alimentaires subissent des changements de coloration avec le temps.

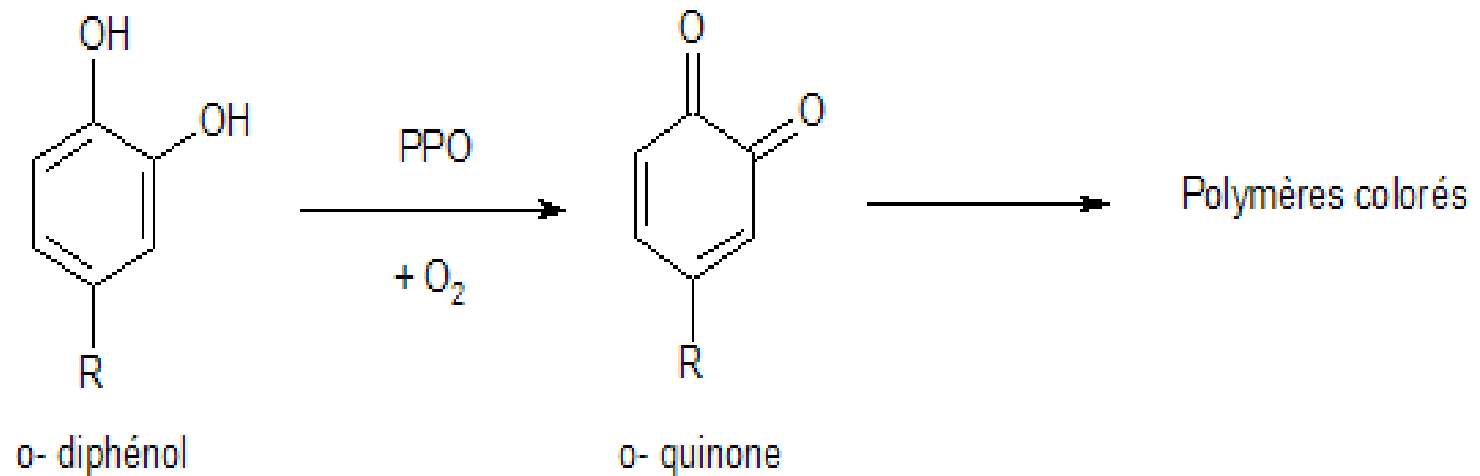
Ces changements de coloration consistent en un phénomène de brunissement qui se produit aussi bien au cours du vieillissement d'aliments frais que pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation.

- Les réactions de brunissement enzymatique (**BE**) concernent surtout les **produits alimentaires d'origine végétale**.
- Ces réactions entraînent une **modification** de l'apparence, de la flaveur et de la qualité nutritionnelle du produit.
- Toutes ces conséquences sont préjudiciables à la **qualité organoleptique de l'aliment**.
- Le **BE** peut dans certains cas **être recherché** lorsqu'il permet d'améliorer l'aspect et le goût des produits alimentaires: Tels que le café, de la maturation des dattes, la fermentation du thé ou la fabrication du cidre
- Le BE **est indésirable** lorsqu'il atteint les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles des aliments.

II-Définition :

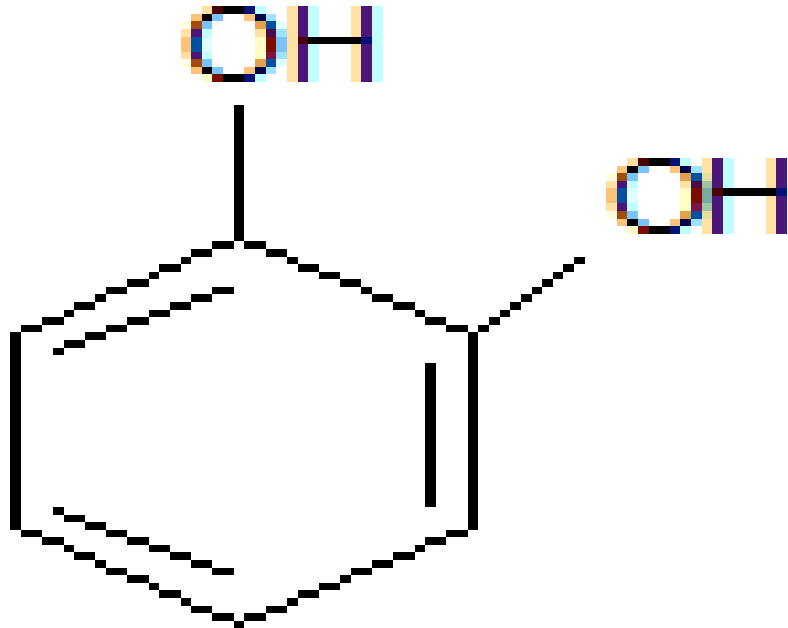
- Le **BE** est le résultat de la **transformation enzymatique** en présence d'oxygène des composés phénoliques en polymères colorés, le plus souvent en brun ou noir sous l'action d'une enzyme : la polyphénol oxydase (**PPO**).
- Cette réaction est d'autant plus importante que les tissus des végétaux sont malades ou lésés.
- L'endommagement par contusion peut résulter d'action de pelage, découpage, broyage, congélation et déshydratation

Schéma du BE



III/ Substrats du BE

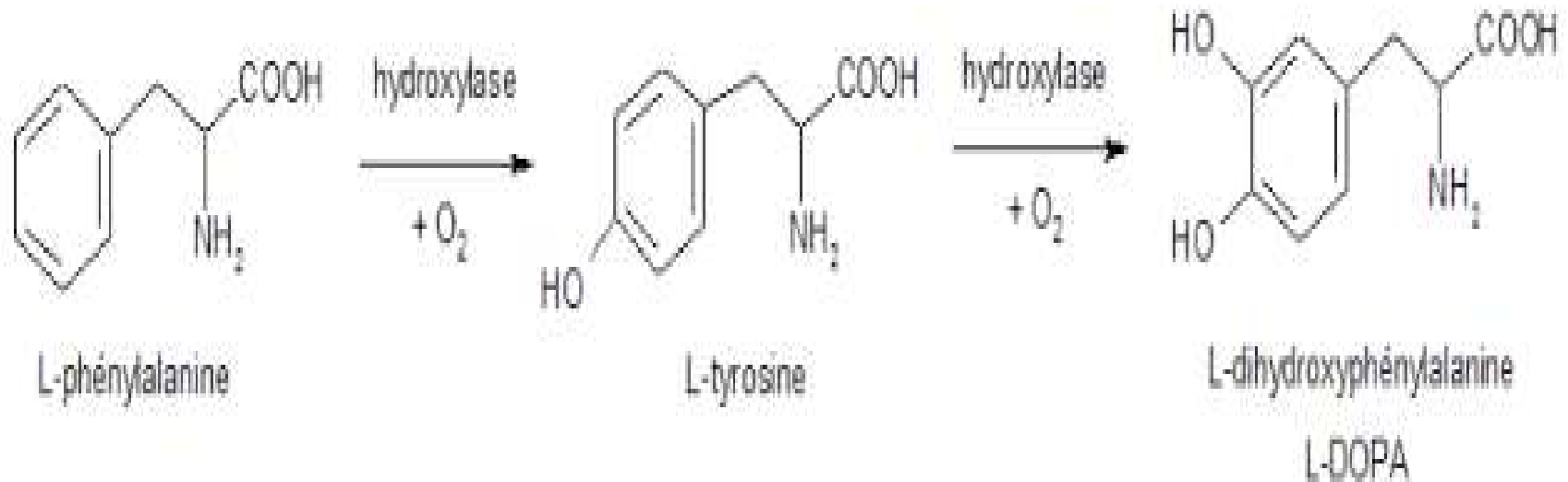
- III-1 Pyrocatéchols
- Les plus simples substrats sont les pyrocatéchols et leurs dérivés.
- Ce sont des dérivés diphénoliques dont la
- structure de base est analogue à celle représentée dans la figure suivante.



pyrocatechol

- III-2 Acides aminés
- Les dérivés de la phénylalanine sont les substrats des **polyphénol oxydases** car cet acide aminé par l'intermédiaire d'hydroxylase à bioptérine peut être **transformé** en:
- tyrosine dans un premier temps puis en
- dihydroxy phényl alanine (**DOPA**) dans un **second temps selon le processus réactionnel suivant :**

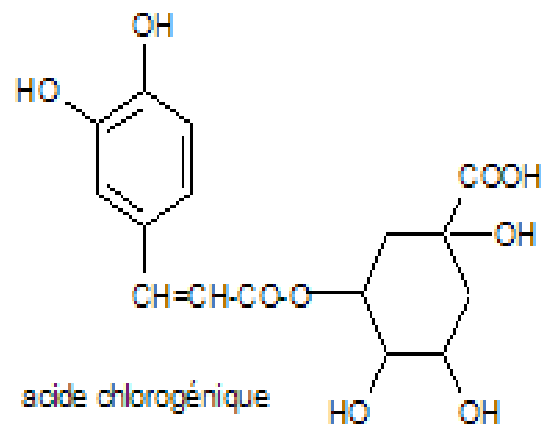
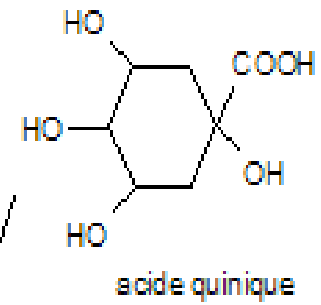
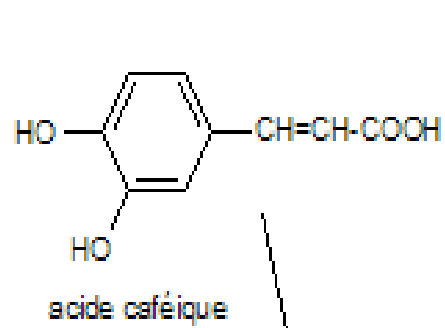
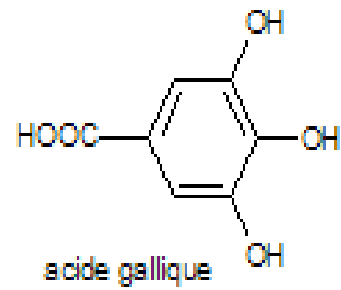
Réaction d'hydroxylation de la phénylalanine



- La **DOPA** sous l'action des **PPO** va pouvoir donner la **DOPAquinone**.
- Dans la banane, la **DOPA** va subir une
➤ réaction de décarbolxylation:
réaction caractéristique des acides aminés) pour donner la 3,4 dihydroxy phényléthylamine ou **DOPAmine**.
- **DOPAmine** : après oxydation sera le principal
- agent de coloration de la banane en cours de mûrissement.

III-3 Acides organiques

- Les acides organiques sont les **substrats** privilégiés des **PPO**.
- Ces enzymes réagiront sur des acides organiques polyphénoliques comme:
- l'acide gallique ou l'acide chlorogénique.
- **L'acide chlorogénique** est constitué par l'association de l'acide quinique et de l'acide caféique (figure suivante).

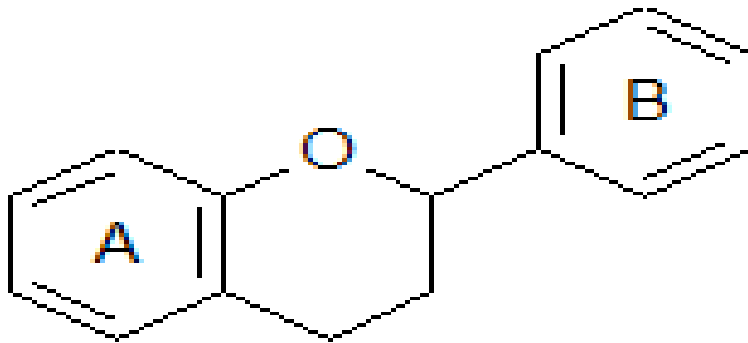


III-3 Acides organiques (suite)

- Il se rencontrent:
- dans les pommes de terre, les pommes, les poires. Lors de la cuisson des pommes de terre et en présence de sel de fer.
- **Apparition** d'une coloration bleue-noire. La réaction et la coloration disparaissent si on est en milieu acide.
- L'idéal serait de cuire à des pH inférieurs à 4 .
- **Inconvénient du couplage de l'acidité et de la chaleur:**
une hydrolyse de l'amidon et perte de la structure du végétal.
- La cuisson pourrait aussi se réaliser en présence d'agent chélateur si la législation le permet.

III-4 Les flavonoïdes

Structure générale d'un flavonoïde:



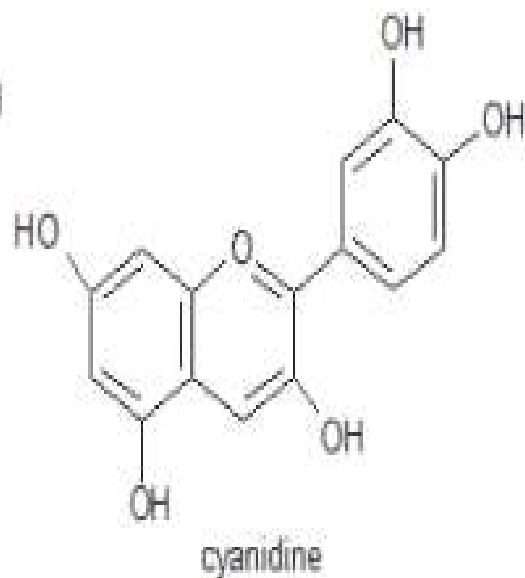
III-4 Les flavonoides (suite)

- Les noyaux A et B pourront être substitués plus ou moins fortement par des fonctions hydroxylées.
- Le noyau A pourra être substitué par des copules saccharidiques.
- La partie réactive de cette structure vis-à-vis des PPO est en général le noyau B qui porte les fonctions mono, di, triphénoliques.
- **Lieu:** les plantes vasculaires, bactéries, champignons. Leur squelette de base : 15 atomes de carbone de type phényl-benzopyrone.
- On pourra caractériser plusieurs familles de composés :

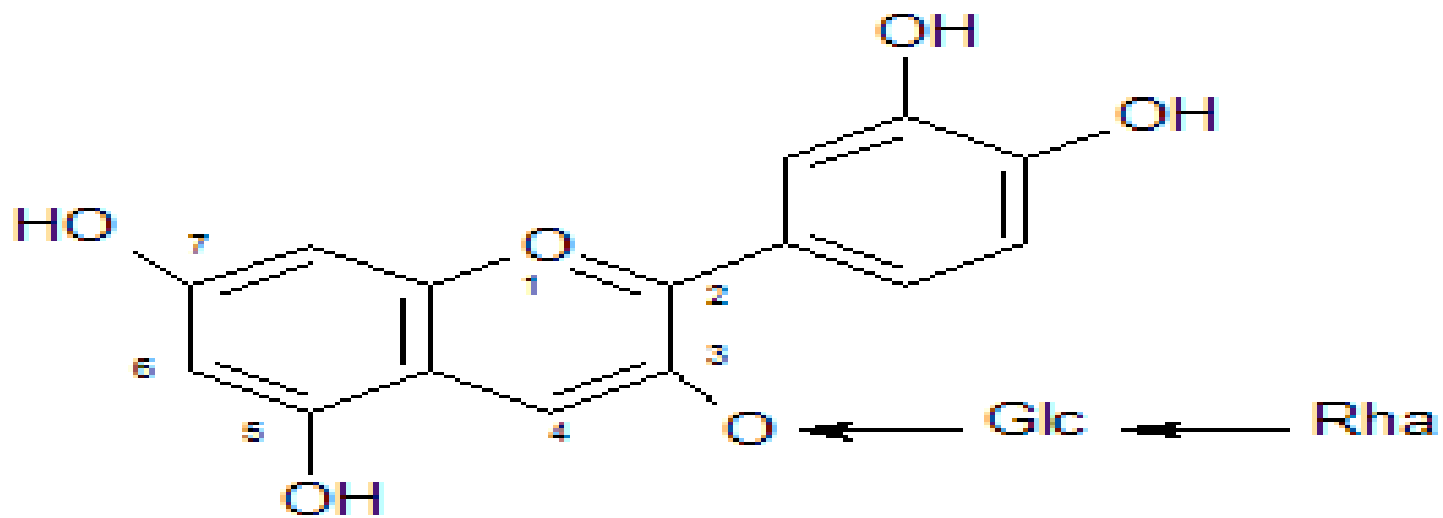
III-4 Les flavonoides (suite)

- ***Les anthocyanidols :**
- regroupent des structures qui pourront être mono ou polyhydroxylées comme:
- la pélargonidine, la cyanidine ou la delphinidine.
- Ces structures sont représentées dans la figure
- suivante.

Structure des anthocyanidols



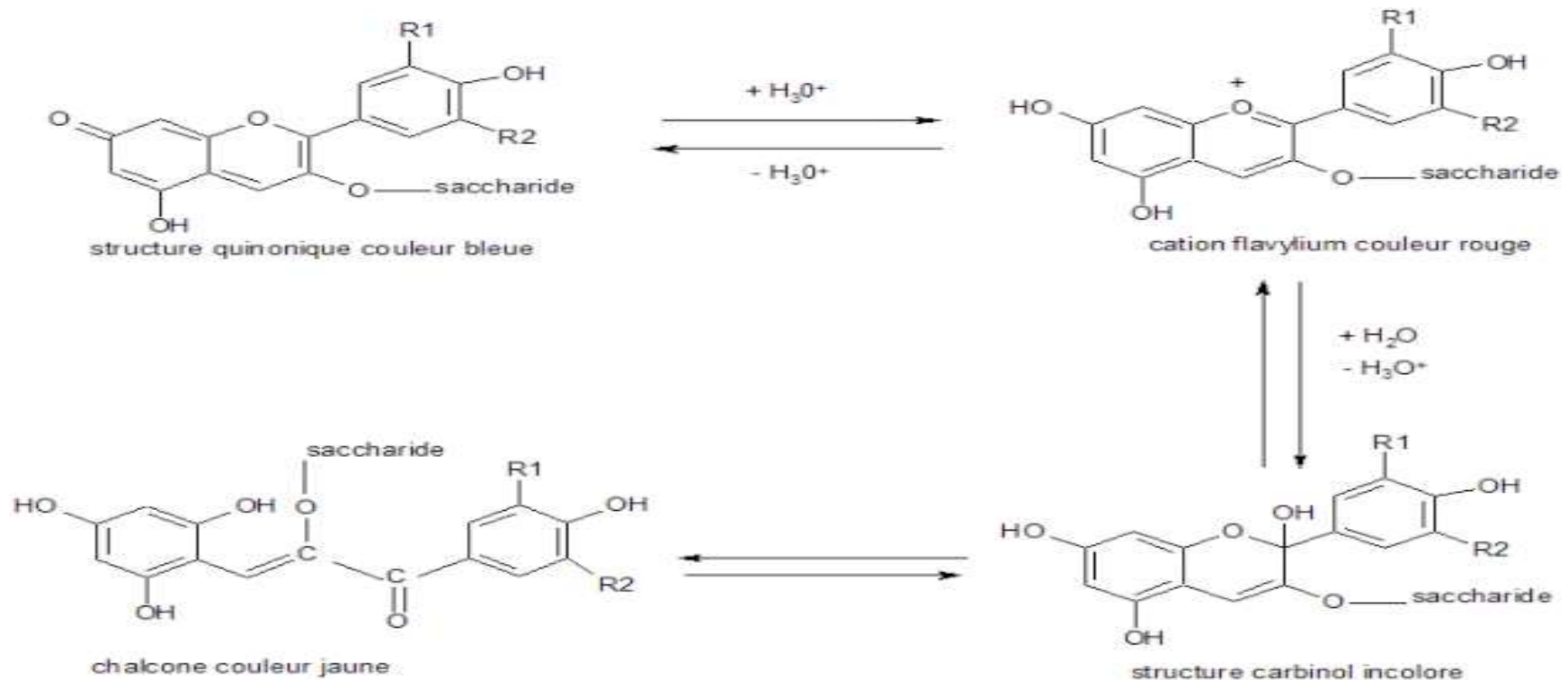
- ***Les anthocyanidols (suite)**
- **Particularité**: Ces molécules peuvent être **glycosylées** en position 3 ou 5 soit par du glucose, du galactose, du rhamnose ou de l'arabinose soit encore par un disaccharide constitué par du glucose et du rhamnose.
- Les saccharides peuvent être par la suite estérifiés par des acides organiques (férulique, caféique...)



structure glycosylée

- Les anthocyanidoles ont la particularité de changer de couleur en fonction du pH du milieu.
- Ces molécules passent du bleu au rouge quand le milieu s'acidifie.
- C'est la couleur des petits fruits rouges, des bleuets, des coquelicots

Variation de coloration des anthocyanidols en fonction du pH

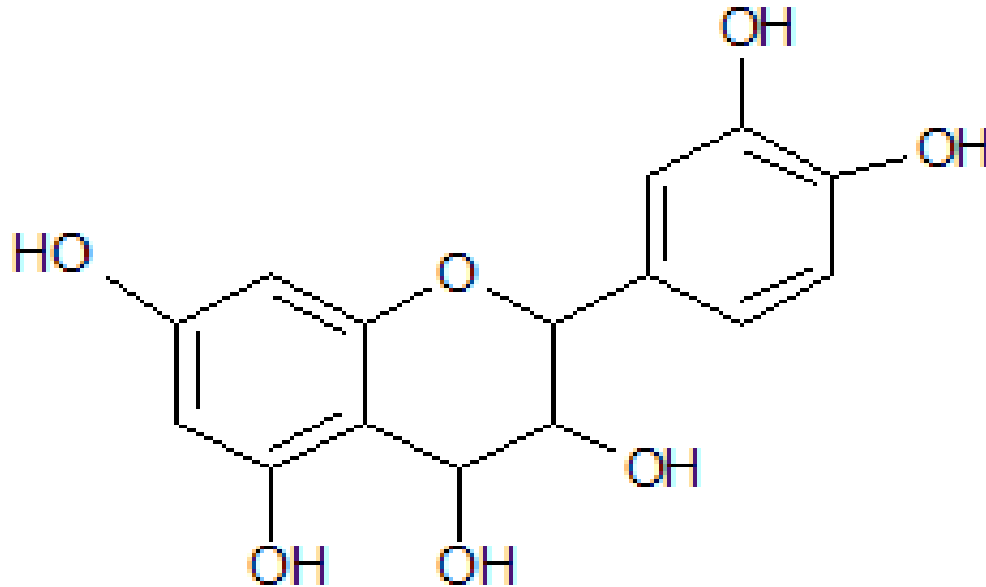


Teinte peut aussi changer lorsque le groupement glucidique est séparé par hydrolyse ou par réaction avec différents métaux (teinte mauve avec l'étain des boites de conserve).

*Les leucoanthocyanidols

- Incolores, ils pourront être transformés en anthocyanidols par oxydation et perte d'eau.
CAS: au cours de la cuisson de certains végétaux en milieu acide
- Exemples : fèves, pommes, poires, les salsifis...
- la coloration passe alors au rose ou au rouge.

Structure des leucoanthocyanidole



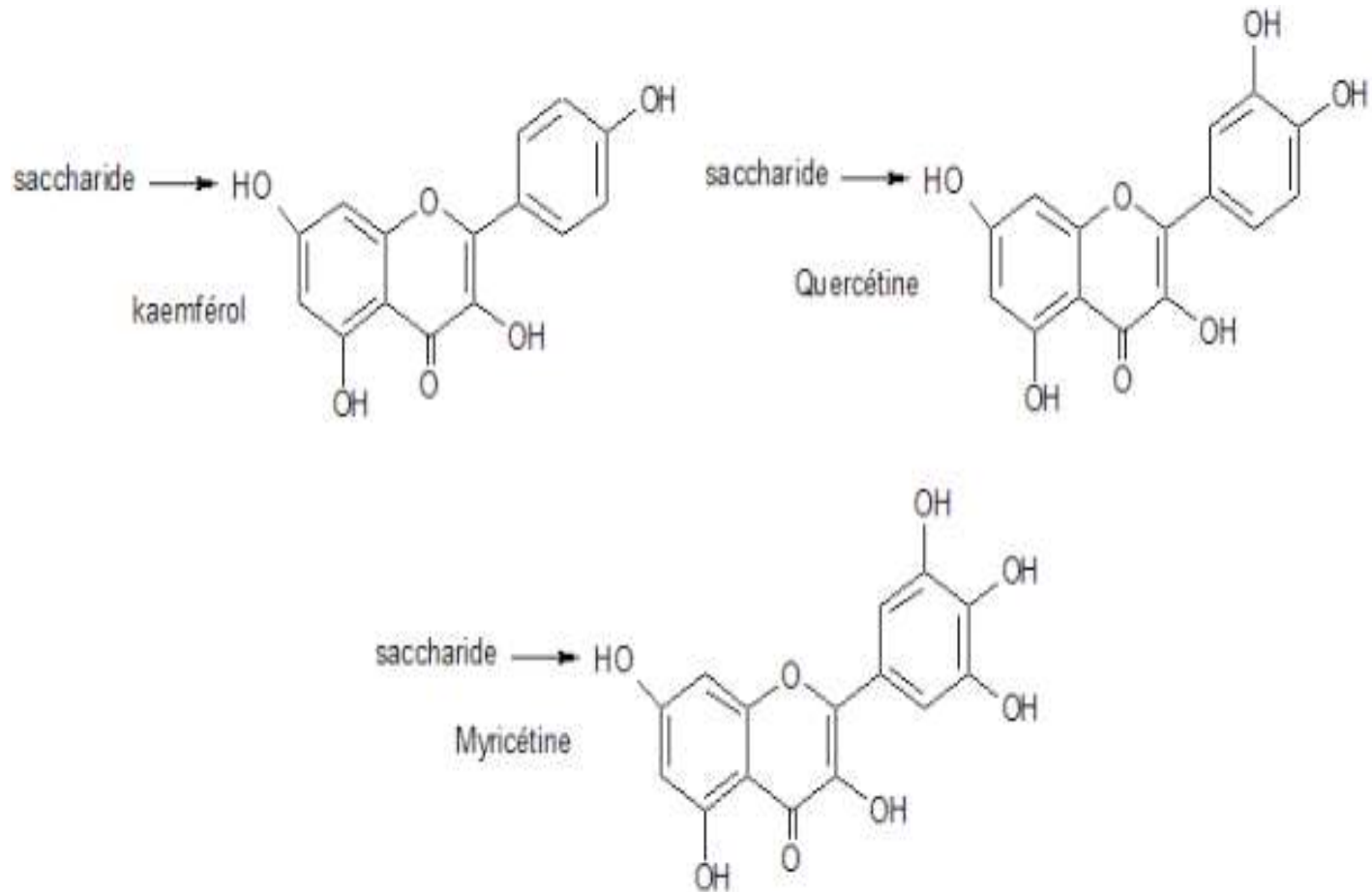
*Les flavonols :

- Les flavonols : caractérisés par une fonction carbonylée et une fonction hydroxylée placées
- en **ortho** l'une par rapport à l'autre.
- Ces structures sont généralement glycosylées en position 7 (réaction d'éthérification).
- Flavonols: groupe très répandu chez les végétaux. Leur teinte est jaune en général.

**Les flavonols (suite)*

- Molécules représentatives de ce groupe sont : le kameférol, la quercétine, la myricétine.
- Ce sont des agents mutagènes et la mutagénicité semble augmenter lorsqu'il y a perte de la copule saccharidique.

**Les flavonols (structure)*



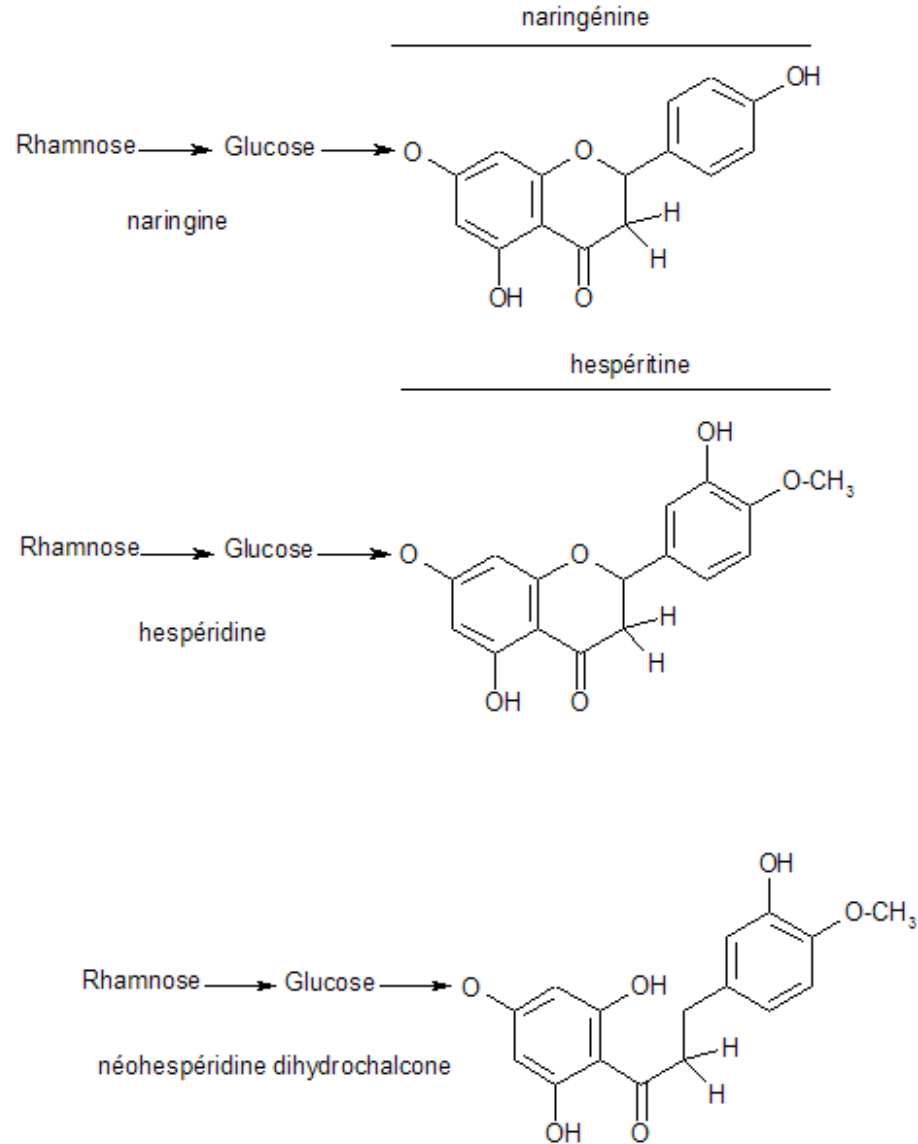
*Les flavanones

- La fonction hydroxylée en C3 est supprimée, le reste de la molécule ne change pas.
- On trouve généralement en position 7 un disaccharide **le rutinoside**
- **Rutinoside** : rhamnose lié à un glucose par une liaison β 1,2 glycosidique

Remarque:

- Cette structure est responsable de l'amertume dégagée par certains végétaux (albedo des agrumes, pépin de raisin...).
- Ainsi la naringine est l'hétéroside de la naringénine
- L'**hespéridine** est l'hétéroside de l'**hespérétine**:
- Molécules qui dégagent **des propriétés édulcorantes** par ouverture du cycle.
- La **néohespéridine dihydrochalcone** est 2000 fois plus sucrée que le saccharose.

Structure des flavanones



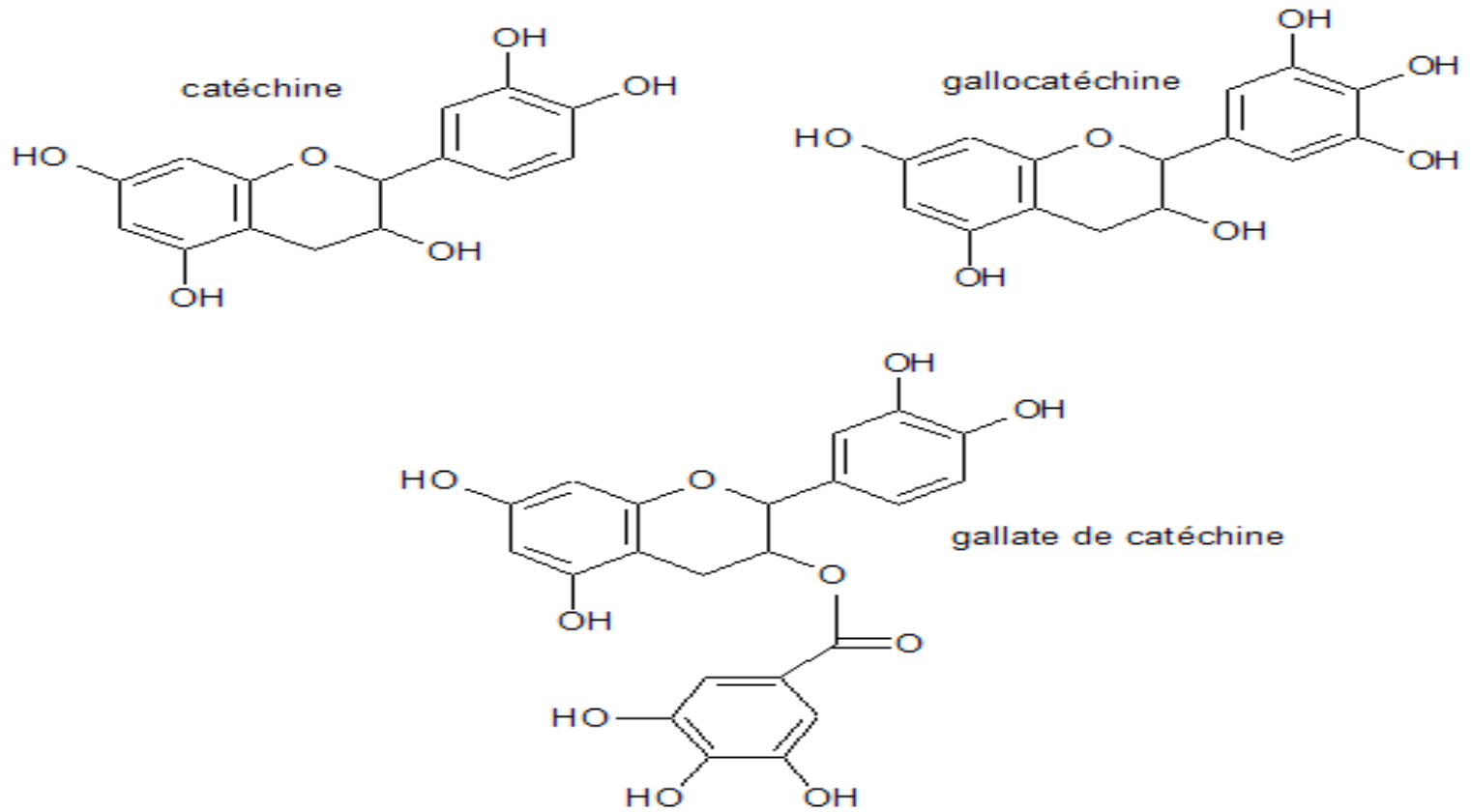
*Les tannins

- Molécules qui vont subir l'action des PPO
- Contribuent également à:
 - la structure des végétaux (incrustation des parois cellulaires)
 - participent à la saveur des aliments, plus particulièrement au niveau de l'astringence (interaction avec les mucines au niveau buccal) et d'une façon générale avec les protéines.
 - Responsables de l'inactivation de systèmes enzymatiques, du trouble de la
- bière, du noircissement des purées de marrons.

Deux classes de tannins

- **Les pyrogalliques:** qui résultent de l'estérification des fonctions hydroxylées d'un saccharide par des acides organiques polyphénoliques (acide gallique, digallique, ellargique, lutéïque...).
- Possibilité d'obtention d'1 estérification des 5 fonctions hydroxylées → **tannins hydrolysables.**
- **Les catéchiques :** structure est assez voisine de celle des anthocyanidoles

Structure des tannins



Les tannins (suite)

- Certains tannins semblent posséder des propriétés intéressantes comme par exemple:
- **l'épigallocatechine 3 gallate** qu'on retrouve dans les feuilles de thé vert.
- Molécule possédant des propriétés anticancéreuses de par
- son action comme inhibiteur de l'urokinase.
- Les extraits de thé vert par tasse:
- renferment jusqu'à **150 mg d'épigallocatechine 3 gallate**
- peuvent compenser leur plus faible réactivité par des prises de quantités plus importantes
- sans effets secondaires.

IV/-Enzymes et mécanisme de réaction

- IV-1-Localisation de l'enzyme

- Dans la pomme immature: l'activité enzymatique uniformément répartie dans le fruit (mitochondries)
- A maturation ; les **PPO** sont localisées au niveau de la peau et de la pulpe.
- Chez le champignon, l'activité **DOPA oxydase** (au niveau des lamelles, du pied et de la peau du carpophore).
- Dans les cellules végétales, les **PPO** sont:
 - soit sous forme soluble (cytoplasme des champignons et des végétaux supérieurs)
 - soit sous forme intégrée aux membranes (localisation prédominante)
- Lieu: membranes internes du chloroplaste où elles sont orientées vers le lumen des thylakoïdes, des peroxysomes ou associées aux parois pecto-cellulosiques (banane).

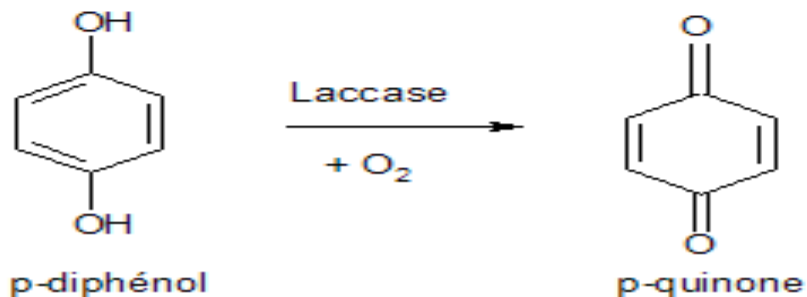
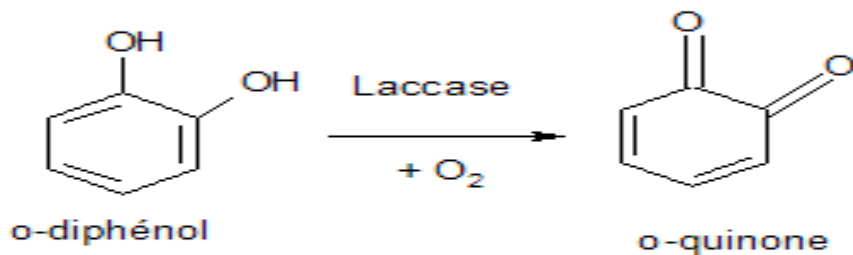
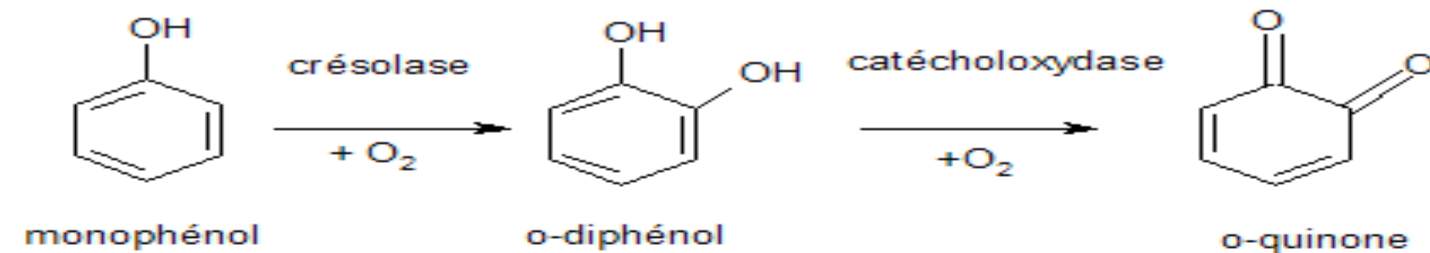
- Pomme de terre : **PPO associées à la membrane des grains d'amidon.**
- Liaison à la membrane est plus ou moins forte, varie selon:
- le tissu et l'état de maturité du végétal.
- Tabac: le lavage des tissus **libère les PPO** des lamelles chloroplastiques.
- Les **PPO** dans l'olive verte matures sont intégrées aux membranes,
- **PPO** solubles peuvent résulter du stress (culture des pommes en milieu peu humide ou en concentration limitante en nutriment ou en absence de facteur de croissance).
- Il existe un phénomène de compartimentation (les composés phénoliques sont localisés dans la vacuole) → ce qui empêche tout contact entre les enzymes et leurs substrats :
- **l'oxydation de ces derniers ne peut donc s'effectuer sauf si les cellules sont blessées ou s'il y a modification de la perméabilité membranaire ou dysfonctionnement cellulaire ou encore modification de la physiologie du végétal.**

IV/-2-Characterisation des enzymes

- Les **PPO** appartiennent au groupe des **oxydoréductases** renfermant du **cuivre**. Elles catalysent
 - l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire.
 - Deux réactions différentes sont caractérisées :
 - a) la transformation de monophénol en diphénol puis:
 - b) transformation des diphénol en quinone.
 - La pomme de terre et les champignons possèdent la double activité
 - la banane n'exprime que la transformation des **diphénols en quinone qui de plus est fonction de la spécificité de substrat**

- *La monophénol monooxygénase ou **crésolase** est susceptible de transformer un monophénol en diphénol.
- *La catéchol oxydase permet l'oxydation des **o-diphénol en quinone**.
- *Les laccases catalysent l'oxydation aussi bien d'o- que de p-diphénols.
- Les **laccases** sont secrétées en abondance par les champignons au cours de leur croissance. Cette activité est absente chez les fruits et légumes

Différentes réactions engendrées par les polyphénol oxydases



IV-3-Caractérisation structurale des enzymes

- Les masses moléculaires apparentes des **PPO** sont comprises entre 12 et 400 kDa.
- La **PPO** des feuilles de thé possède une masse moléculaire de 140 kDa et 7 atomes de cuivre.
- Ce cuivre n'est pas lié par liaison de covalence, il peut être facilement éliminé par dialyse contre un agent chélateur (EDTA).

IV-3-Caractérisation structurale des enzymes (suite)

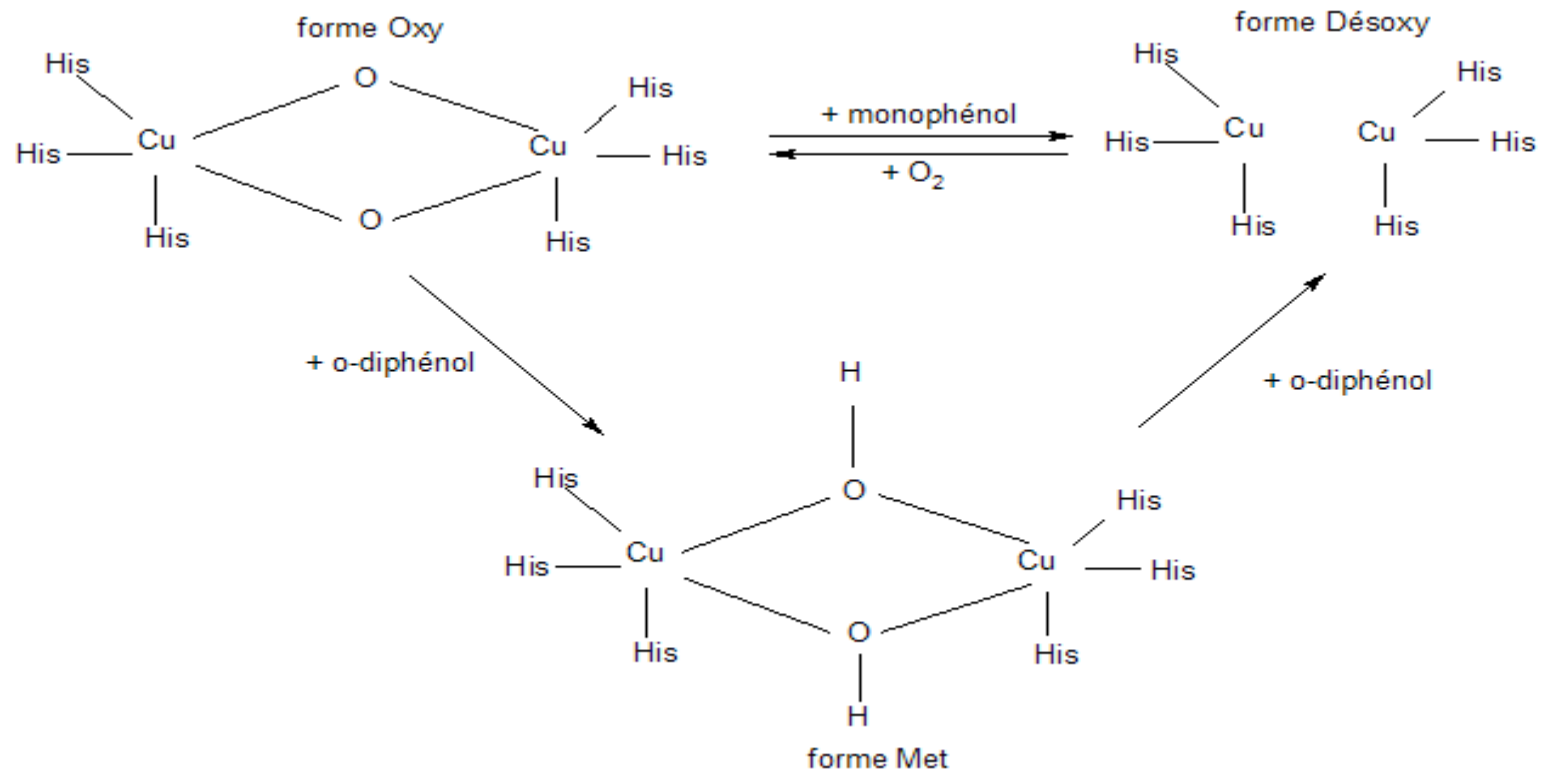
- D'un point de vue réactionnel:
- le cuivre se fixe sur l'enzyme avant que celle-ci ne s'associe à l'oxygène
- ensuite se fixe au polyphénol dans un deuxième temps selon un mécanisme de type bi-bi ordonné.
- Formes réactionnelles de l'enzyme: **forme Oxy, Désoxy et Met**. La forme Met représente
- l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques

IV-3-Caractérisation structurale des enzymes (suite)

- Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif passe alors sous forme Désoxy dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite.
- Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme Oxy.

IV-3-Caractérisation structurale des enzymes (suite)

- Cette dernière forme peut prendre en charge aussi bien les mono que les o-diphénols.
- Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine
- Le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme Désoxy). Ces phénomènes sont liés à de légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (figure suivante)



IV-4 Mécanisme réactionnel

- L'activité optimale des PPO se situe dans une gamme de pH entre 4 et 7.
- Pour une enzyme d'origine donnée, le pH optimum varie en fonction du substrat.
- Mêmes Conditions pH optimal de la PPO d'abricot:
- 4,4 lorsque le 4-méthylcatéchol est employé
- 6,6 lors de l'oxydation de l'acide chlorogénique.

IV-4 Mécanisme réactionnel (suite)

- Les enzymes peuvent résister jusqu'à des températures de l'ordre de 70°C.
- Les enzymes sous forme de proenzyme qu'il était possible d'activer par:
 - Des ions H_3O^+
 - des acides gras (acide linoléique)
 - par modification de la conformation

IV-4 Mécanisme réactionnel (suite)

- Exple: les phénol oxydases (tyrosinases) activées par protéolyse.
- Prophénol oxydase ↑
SERINE PROTEASE Phénol oxydase

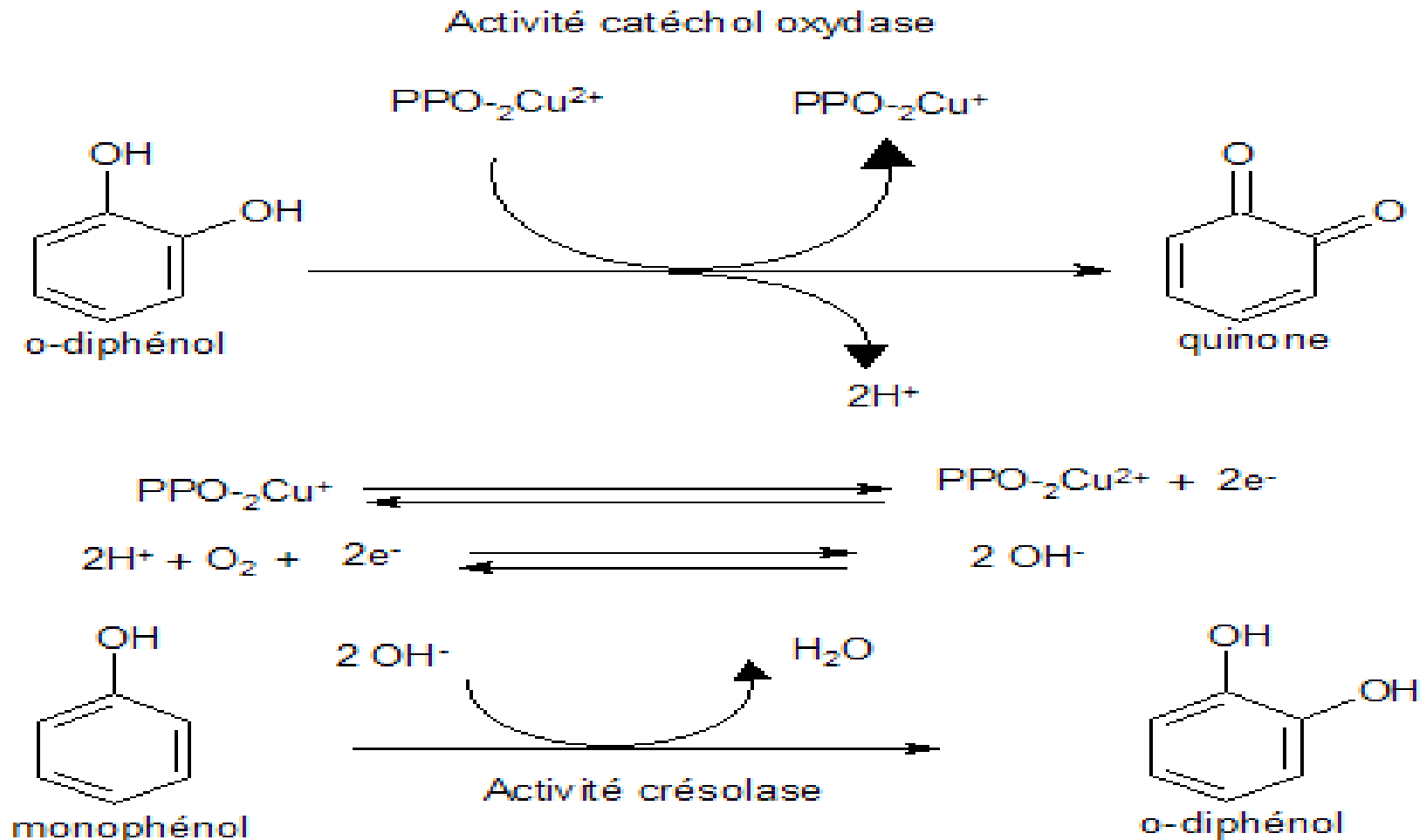
Phénol oxydase dirigée vers l'oxydation de la tyrosine.

- Conditions:
 - structure de l'enzyme et des substrats, conditions expérimentales.
 - La nature et la position des substituants sur les mono ou les o-diphénols
 - L'affinité la plus faible est dirigée vers les substitutions en position méta

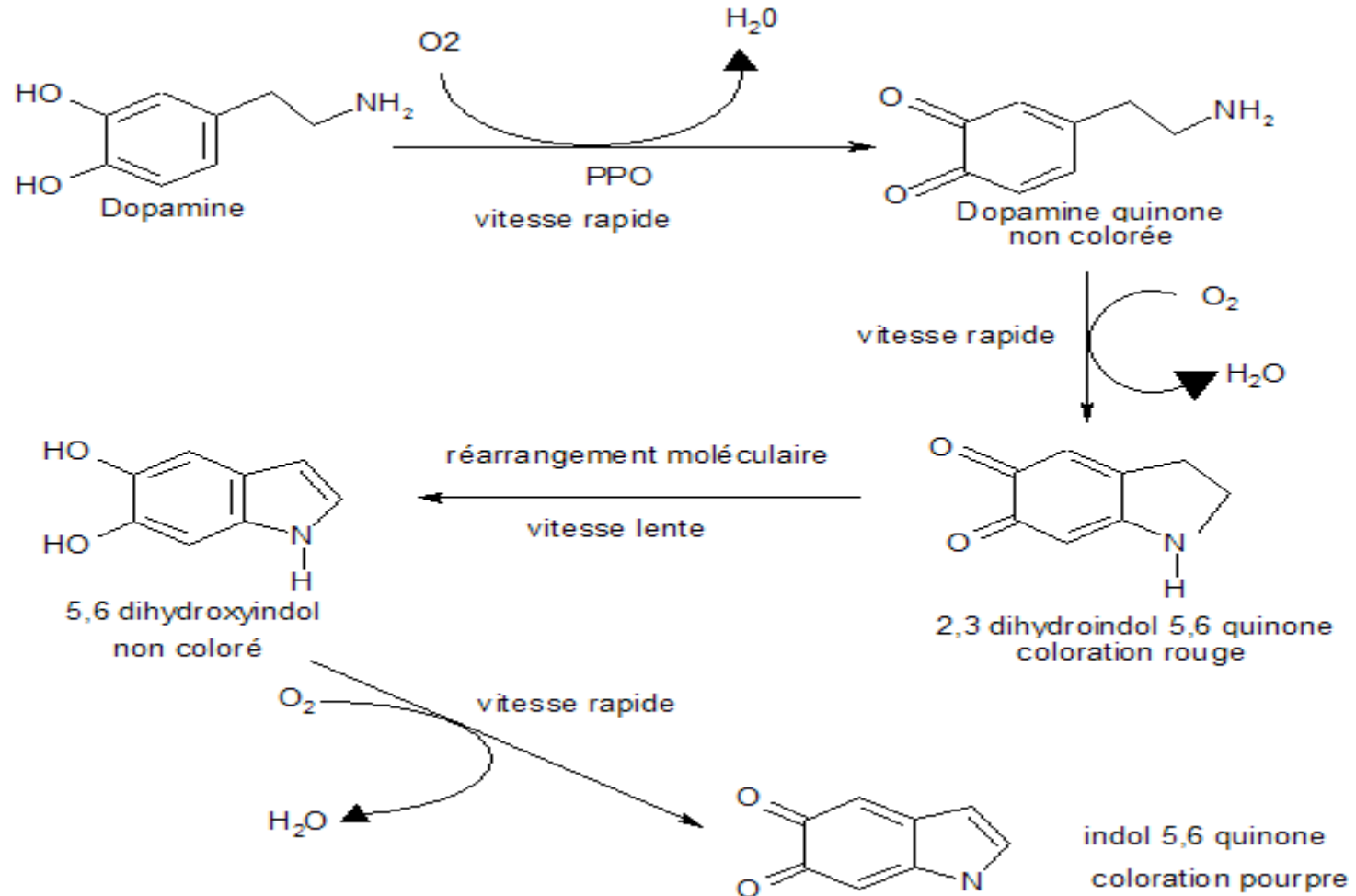
Fondamental :

- La réaction de **BE**: réaction **d'oxydo-réduction** où le **cuivre** va jouer un grand rôle
 - avec le passage des formes cuivriques (Cu^{2+}) aux formes cuivreux (Cu^{+}) et où la régénération de l'**activité** de la:
- **PPO** va se réaliser à partir de l'oxygène moléculaire.
- La régénération de la PPO peut aussi se réaliser par l'intermédiaire de la **transformation** d'un monophénol en diphénol.

Transformation des monophénols en diphénols



Exemple: murissement de la banane



- **Explication**
- Il est à noter que seule la première étape est catalysée par les **PPO**, toutes les autres étapes sont des oxydations chimiques.
- La vitesse globale de coloration dépend en fait de la vitesse du réarrangement moléculaire qui est le
- facteur limitant avec une faible vitesse de réaction.
- Après l'obtention de l'indol 5,6 quinone, l'obtention de mélanoidines est très rapide.
- Ces polymères obtenus quand les quinones réagissent avec des molécules du type R-NH₂ ou R-SH.

V/-Prévention des réactions du BE

- Pour **limiter** voire **inhiber** complètement les réactions de **brunissement** non enzymatiques (réaction de Maillard) ou enzymatiques (Polyphénol oxydases).
 - Mettre en évidence des **traitements** qui seront d'une part communs aux deux types de réactions,
- Examen des produits intermédiaires :
 - Présence de structures carbonylées (aldéhyde, cétone, quinone...)
 - Traitements spécifiques de l'une ou l'autre des réactions de brunissement.
 - Facteurs influençant ces réactions (pH, température, aw, inhibiteurs...).

V-1Élimination du substrat

- végétaux: sélectionner des espèces végétales ne renfermant que peu de composés polyphénoliques.
- Préparation des jus de fruits : traiter les extraits
- par le **polyvinylpolypyrrolidone** (PVPP), le charbon actif ou la bentonite qui adsorbera les dérivés phénoliques.

Autres composés : les **cyclodextrines** pour piéger l'acide chlorogénique et les flavonols.

les cyclodextrines n'ont aucun effet sur des phénols ayant un fort caractère hydrophile comme la dopamine (substrat naturel de la PPO de banane)

V-2 Modification du pH

- un jus de citron pour éviter le brunissement de la découpe d'une pomme

Cette technique est très utilisée pour contrer les brunissements enzymatiques dans la mesure où l'on travaille à des pH de l'ordre de 2,7-2,5. (PPO inactives)

- Trempage dans des bains acides, l'acide le plus utilisé est l'acide citrique , l'acide malique.

V-3 Modification de la température

- **L'inactivation des PPO** peut se réaliser par une opération de blanchiment (pasteurisation, appertisation).
- Inconvénients: profonde modification de texture et des propriétés organoleptiques des végétaux. Peut se concevoir pour les légumes, on ne peut l'utiliser pour les fruits.
- On peut aussi diminuer l'intensité de la réaction en abaissant la température aux environs de $40^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

V-3 Modification de la température (suite)

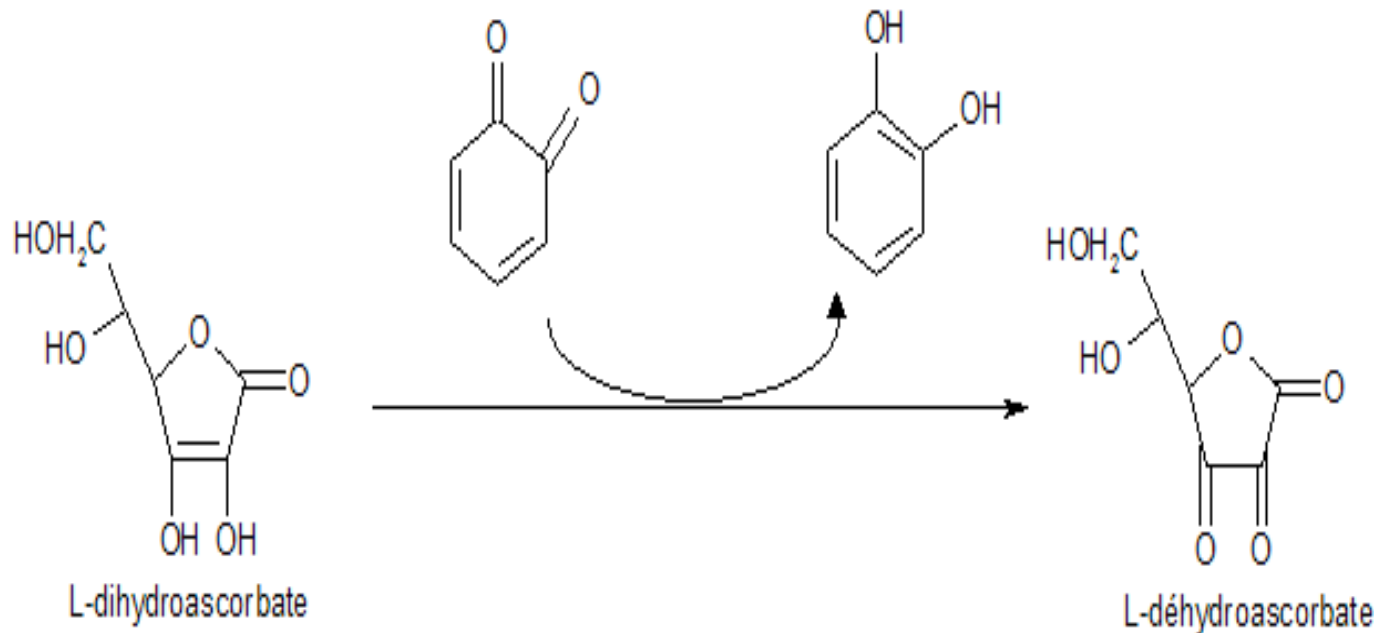
- La congélation n'est pas une solution adaptée car à moins d'être effectuée à très basse température
- Car Formation de cristaux de glace au niveau cellulaire. Ces cristaux vont :
 - Favoriser la perméabilité membranaire
 - Mettre en présence **substrat et enzyme** lors de la décongélation et de la remontée en température
- FAVORISANT AINSI LA REACTION DE BRUNISSEMENT.

V-4 Utilisation des agents réducteurs

- Les sulfites réagissent à la fois au niveau des **PPO** et sur les produits de la réaction.
- Réactifs impliqués et capables d'inactiver les PPO des végétaux
- les ions sulfite (SO_3^{2-}) et bisulfite (HSO_3^-)
- Inactivation :
 - efficace avec des pH plus acides
 - Favorise le changement de structure tertiaire ou ionisation de la **PPO** (suite à la réduction de ponts disulfure).

- Exple: Produits de la réaction de **BE** traités par la vitamine C (forme réduite ou oxydée).
- Traitement alternatif de choix aux sulfites (faible coût et ses propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires)
- Elle est essentiellement utilisée pour:
traiter les fruits en tranches, en segments ou en morceaux.
- L'acide ascorbique est employé contre le BE de la pomme, de l'avocat, de la poire, de la banane et de la pomme de terre, en combinaison avec l'acide citrique, le métabisulfite de sodium (0,05 %) et l'EDTA ainsi que les ions chlorures.

Mécanisme d'action de la vitamine C



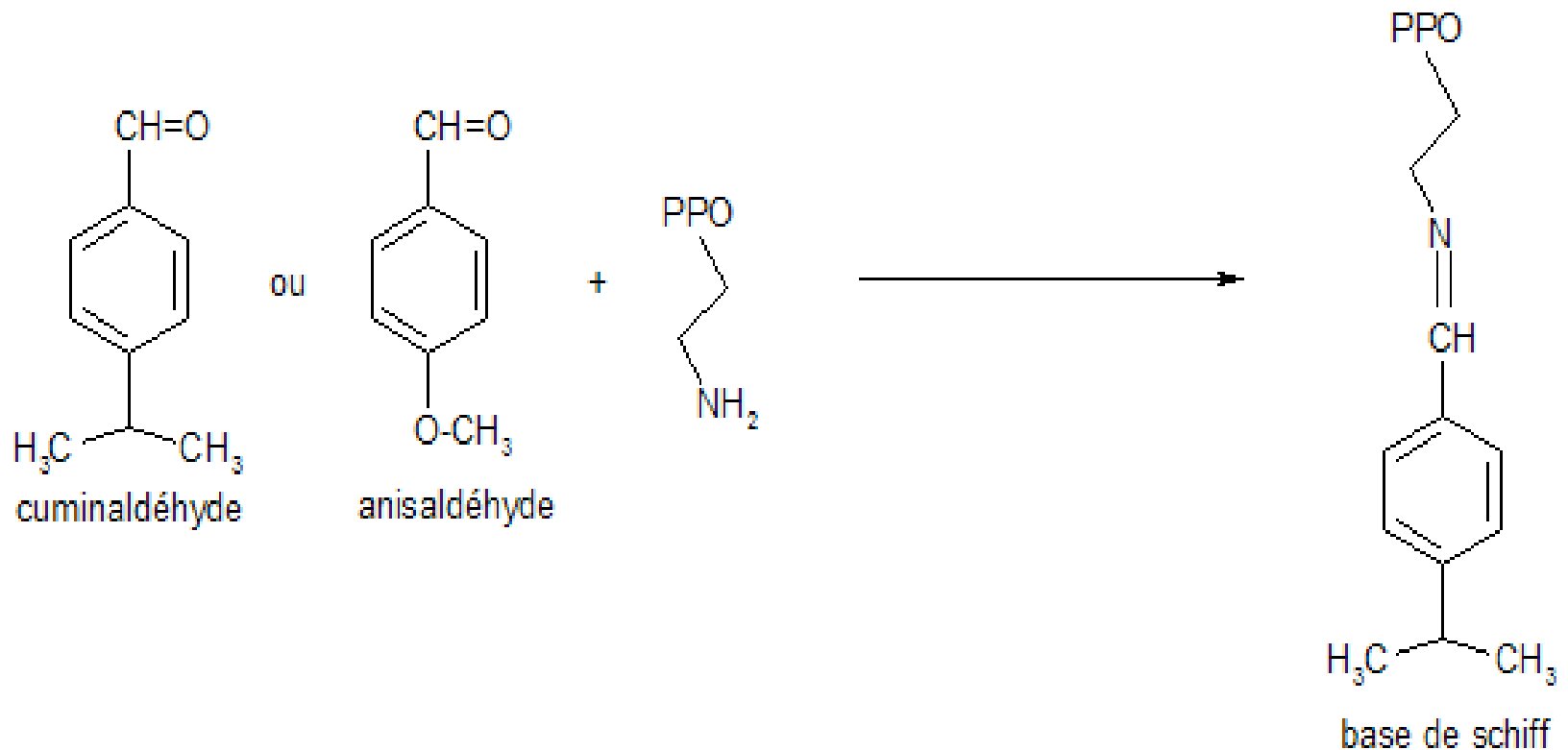
VI-Procédés spécifiques pour inhiber les réactions de brunissement

- Techniques qui permettent d'inhiber les réactions de BE.
- La réaction enzymatique elle même agit en **4 niveaux**:
 - 1-au niveau de l'enzyme
 - 2- au niveau du cuivre,
 - 3- au niveau du site de fixation du **substrat polyphénolique**
 - 4- au niveau de l'oxygène de l'air.

VI-1 Action au niveau des PPO

- Diminuer la teneur en **PPO (génétique)**
- Diminuer le taux de dérivés polyphénoliques (sélection).
- Utilisation de réactifs capables de réagir avec les fonctions amines libres des structures **polypeptidiques des PPO** en donnant des bases de schiff stables.
- Ce groupe **d'inhibiteurs** non compétitifs est constitué principalement **d'aldéhydes et d'extraits de végétaux**

Action des aldehydes sur les extraits végétaux



VI-2 Action au niveau de l'interaction avec le cuivre

- Les composés chélateurs de métaux forment des **complexes** avec les atomes de cuivre du centre actif des **PPO**

Cette inactivation s'accompagne de **l'arrachement** d'un des deux **atomes de cuivre** de l'enzyme conduisant à une **forme inactive** nommée metapo, l'atome de cuivre encore fixé à l'enzyme restant sous forme oxydée

VI-3 Action au niveau du site de fixation des structures polyphénoliques

- Groupe d'inhibiteurs compétitifs des **PPO** tels que les acides carboxyliques et plus particulièrement des acides benzoïques, cinnamiques et phénylalcanoïques.
- leur action est due au fait qu'ils sont des analogues de structure des phénols-substrats
- _ possèdent un faible caractère oxydable.
- Toutefois, le type d'inhibition observé peut varier selon le substrat ou la source enzymatique.

VI-3 Action vis-à-vis de la fixation d'oxygène

- Limiter la pression partielle en oxygène au niveau du système enzymatique.
- Utilisation d'agents anti-oxydants synthétiques (E300 à E321)
- utilisation des techniques du vide ou le barbotage sous gaz inerte (azote).
- Eviter que le tissu végétal soit en anaérobiose (pb de fermentation)

- **Couplage** de la **glucose oxydase** avec la **catalase** qui par la **transformation** du glucose en gluconolactone:
- permet de réduire la quantité d'oxygène présente dans le milieu.
- Augmente de l'acidité
- Ce qui diminue aussi la réactivité des PPO.

- L'utilisation d'emballage imperméable à l'oxygène permet d'augmenter la durée de vie des produits.
- L'emballage des fruits et légumes doit être perméable et contrôlé.
- Leur respiration augmente la teneur en eau du milieu qui pourrait favoriser le développement des moisissures

Liste des documents consultés

- 1- Cheftel JC et Cheftel H., 1980, Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Edition Technique et Documentation , Volume1.pp333-352
- 2-Romain J., Grogennec T ;, Schuck P, Brul » G. 2006, Sciences des Aliments Biochimie- Microbiologie Procédés-Produits Tome1 Edition Lavoisier TEC et DOC .pp143-161
- 3- Sarni-Manchado P., Cheynier V. , 2006 Les polyphénols en Agro alimentaires Tec et Doc, Lavoisier, ISBN 9782743008055