



Institut des régions chaudes



## **Mémoire de fin d'études**

**présenté pour l'obtention du diplôme**

**Ingénieur des systèmes agricoles et agroalimentaires durables au Sud  
(SAADS)**

**Option Industrie agroalimentaire au Sud (IAAS)**

### **Etude de l'impact de la maturité sur la qualité du *Piper borbonense* -poivre sauvage de La Réunion**

**par VAÏTILINGOM BORIS**

**Année de soutenance : 2016**

**Mémoire préparé sous la direction de : Professeur Philippe Bohuon**

**Organisme d'accueil : Cirad UMR QualiSud, Saint-Pierre, La Réunion**

**Maître de stage : Mathieu Weil**

#### **Jury**

<b>Manuel Dornier</b>	<b>Professeur, Montpellier Supagro</b>	<b>Président</b>
<b>Philippe Bohuon</b>	<b>Professeur, Montpellier Supagro</b>	<b>Tuteur</b>
<b>Nawel Achir</b>	<b>Maître de Conférences, Montpellier Supagro</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Isabelle Maraval</b>	<b>Chercheur, Cirad Montpellier</b>	<b>Examinatrice</b>

## **Avant-propos**

Etudiant en dernière année Ingénieur Systèmes Agricoles et Agroalimentaires Durable dans les Pays du Sud (SAADS), option Industries Agroalimentaires (IAAS), j'ai effectué mon stage de fin d'étude au sein de l'Unité Mixte de Recherche QualiSud du Cirad à La Réunion. Ce projet de recherche appliquée a suscité mon intérêt par ses enjeux de valorisation de filières agricoles, et d'une épice typique de la région de l'Océan Indien.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, je remercie :

Monsieur Mathieu Weil, mon maître de stage, pour son encadrement et sa sympathie, ses conseils avisés, ses corrections, sa patience, sa confiance et sa bienveillance. De manière générale je le remercie pour tout, une belle rencontre, aussi bien professionnelle que personnelle.

Monsieur Philippe Bohuon, mon tuteur pédagogique, pour son suivi et son encadrement tout au long de mon stage.

Je tiens à remercier également l'équipe QualiSud de Saint-Pierre et particulièrement :

Mathilde Hoarau et Jérôme Minier pour leur appui en laboratoire, leur patience et leur partage de connaissances.

Sophie Assemat et Fabrice Davrieux qui ont encadré, respectivement, des essais NIRS et les analyses sensorielles.

Bastien Barral, Marc Chillet et Jean-Christophe Meile pour leur bonne humeur quotidienne. Bon match à eux !

L'ensemble des chercheurs, doctorants, VSC et stagiaires du Pôle Elevage pour tous ces bons moments passés ensembles en randos ou en soirée.

Merci aussi à la famille Sidou et al., pour leur accueil et leur intégration à La Réunion, merci d'avoir rendu cette expérience unique.

Ce mémoire marquant la fin de mes études d'ingénieur, je tiens à remercier tous les membres de ma famille et particulièrement ma mère et mon parrain, pour leurs sacrifices, leurs soutiens morale et financier, pour leurs encouragements tout au long de mon cursus.

Une pensée à mon père, parti bien trop tôt...

# Table des matières

Introduction .....	1
1. Etude Bibliographique .....	2
1.1 Le poivre dans le monde.....	2
1.2 Les critères de qualité du poivre .....	2
1.3 Facteurs influençant la qualité du poivre.....	3
2. Etude de l'impact de la maturité sur la qualité du poivre.....	6
2.1 Résumé et mots clefs.....	6
2.2 Introduction.....	7
2.3 Matériels et méthodes .....	8
2.4 Résultats .....	13
2.5 Discussion .....	20
2.6 Conclusion partielle.....	23
3. Etude de l'inactivation des enzymes lors de l'échaudage.....	24
3.1 Matériels et méthodes .....	25
3.2 Résultats et Discussion .....	28
Conclusion générale.....	31
Bibliographie .....	32
Annexe 1 : Résultats des analyses sensorielles .....	34
Annexe 2 : Protocole de détermination de l'activité enzymatique du poivre (PPO et POD).....	38
Annexe 3 : Réduction de l'activité enzymatique (PPO et POD) .....	44
Annexe 4 : Représentation logarithmique de la réduction de l'activité enzymatique (PPO) .....	45

## Résumé

Le poivre sauvage de La Réunion, *Piper borbonense*, caractérisé par son profil aromatique, son léger piquant et sa couleur rouge, présente un fort potentiel jusqu'à maintenant peu exploité. Cette étude a eu pour but de mesurer l'impact de la maturité de ce poivre sur les critères de qualité suivants : teneur en pipérine, teneur et composition en huile essentielle et couleur. Pour cela, nous avons travaillé sur 3 maturités A, B et C, distinctes visuellement et correspondant à des dates de cueillette différentes. Les mesures ont été réalisées sur du poivre frais et séché, c'est-à-dire prêt à consommer, afin de tenir compte de l'éventuelle influence de la structure des grains (qui évolue selon maturité) sur le devenir des composés d'intérêts au cours du procédé. Des analyses sensorielles ont également été réalisées. Les résultats obtenus ont montré que le poivre de maturité A semblait avoir atteint son potentiel aromatique maximum. Au-delà de ce stade, les teneurs en huile essentielle mais aussi en pipérine diminuaient dans les poivres frais et transformés. Les compositions aromatiques étaient globalement peu impactées par la maturité et les procédés. Inversement, la couleur augmentait au cours de la maturité mais était fortement impactée par le procédé de séchage, et cela quelle que soit la maturité. Au niveau sensoriel, les quelques différences perçues, se sont révélées difficiles à corrélérer avec les variations biochimiques.

A l'échelle d'une filière, la récolte des grains immatures, possédant les teneurs les plus élevées en composés d'intérêt, ne satisferait pas les besoins en termes de rendements de production.

En conclusion, il s'est avéré plus pertinent de cueillir le poivre lorsqu'il est mature afin de répondre aux exigences de rendement tout en conservant des teneurs en composés d'intérêts satisfaisantes ainsi qu'une belle couleur rouge après procédé.

La couleur du poivre de La Réunion est en partie dégradée par du brunissement enzymatique. Les paramètres cinétiques d'inactivation des enzymes responsables (PPO et POD) ont été estimés. À partir du modèle établi, un barème d'échaudage optimal, à 100°C pendant 30 secondes, a pu être défini.

Mots clefs : poivre, maturité, pipérine, huile essentielle, composés aromatiques, couleur, qualité sensorielle, brunissement enzymatique, paramètres cinétique d'inactivation.

## **Abstract**

Reunion Island wild pepper, *Piper borbenense*, characterized by a specific aroma profile, a light spiciness, and a red color, present a significant yet untapped potential. This study aims at assessing the impact of the pepper maturity on its quality according to the following criteria: piperine content, essential oils content and composition, and color. Maturity was classified in 3 categories A, B, and C visually distinguishable and based on the harvesting time. Measurements were carried out on fresh and dried pepper i.e. ready to eat, in order to take into account the grain structure (maturity dependent) on the fate of the studied compounds. Sensorial analyses were also performed. Results showed that maturity-A pepper reached the highest aromatic potential. Fresh and processed peppers of higher maturity showed lower content both in essential oils and piperine. Maturity and processing showed generally little impact on aromatic composition. However, color was more intense for higher maturity despite being strongly impacted by the drying for all maturities. Sensorial analysis results had poor correlation with the biochemical content analysis. On a global scale, harvesting immature peppers with the higher contents in the compounds of interest would not be economically viable.

Pepper berries harvested fully matured (Maturity C) gave the best compromise between high yield production, and satisfying content of piperine and essential oil combined with slight red color after treatment

The red color of Reunion Island wild pepper is affected by enzymatic browning. Parameters for the kinetic of inactivation of the concerned enzymes (PPO and POD) were calibrated. A model was developed showing the optimal blanching conditions were 100°C for 30 seconds.

**Keywords :** pepper, maturity, essential oil, piperine, aromatic compounds, color, sensorial analysis, enzymatic browning, kinetic, PPO, POD.



## Introduction

Le poivre sauvage de La Réunion, *Piper borbonense*, caractérisé par son profil aromatique, son léger piquant et sa couleur rouge, présente un fort potentiel jusqu'à maintenant peu exploité

Le projet de recherche et développement Qual'Innov est financé par la région Réunion, l'Etat français et l'Union Européenne. Il vise à caractériser et valoriser les poivres sauvages de la Réunion et de Madagascar. Pour la Réunion, il s'agit d'évaluer le potentiel de développement d'une « filière poivre haute valeur ajoutée ». Pour Madagascar, il s'agit d'optimiser les procédés de transformation existants.

Maîtriser les procédés de transformation pour l'obtention de produits à haute valeur ajoutée est indispensable pour le développement d'une filière. Il s'avère donc important d'identifier et de comprendre les opérations unitaires critiques afin de proposer un poivre de qualité.

D'autres paramètres peuvent influencer cette qualité, parmi lesquels l'espèce, le terroir, le climat, les conditions de culture, la maturité à la cueillette ou encore les pratiques post-récolte jusqu'au mode de consommation. L'essentiel de ce travail a consisté à étudier l'impact de la maturité sur la qualité de poivres frais et transformés dans le but de déterminer un stade de récolte optimum qui s'appliquerait au *Piper borbonense* de la Réunion et vraisemblablement aux poivres sauvages malgaches qui sont des espèces voisines. La qualité a été évaluée à travers le piquant (teneur en pipérine), l'arôme (teneur et composition en huile essentielle), la couleur et l'analyse sensorielle du poivre. Quelques travaux ont par ailleurs été menés spécifiquement sur la couleur, dans le but de mieux comprendre et maîtriser sa dégradation au cours des procédés.

Ce mémoire est constitué de trois parties : une analyse bibliographique décrivant les critères de qualité du poivre et ses procédés de transformation. Une seconde partie sur l'impact de la maturité, rédigée sous la forme d'une publication scientifique. Et enfin une troisième partie sur l'inactivation des enzymes présents dans le poivre.

# 1. Etude Bibliographique

## 1.1 Le poivre dans le monde

Le poivre, longtemps considéré comme le roi des épices par son pouvoir aromatique, est originaire de la côte de Malabar en Inde. Aujourd'hui il est cultivé dans de nombreuses régions tropicales. Le monde compte environ 700 espèces de poivre (Sumathykuty, Rao, Padmakumari, & Narayanan, 1999 ; Weil et al., 2014) parmi lesquelles le *Piper nigrum*, avec plus de 450 000 tonnes par an (FAO Statistics Division, 2015), est de très loin la plus produite au monde. Cependant grand nombre d'entre elles sont des espèces sauvages, donc non cultivées.

A La Réunion, le taxon *Piper borbonense* a été identifié par le Conservatoire Nationale Botanique de Mascarin. Ce poivrier se présente comme une liane dioïque à tige ligneuse atteignant un diamètre de 4-5 cm à la base et grimpant à une hauteur de 5-10 m sur les arbres tuteurs. A Madagascar, une ou plusieurs espèces de poivres sauvages proches du *Piper borbonense* réunionnais, cohabitent. Actuellement il n'existe que très peu de travaux réalisés sur le *Piper Borbonense* de la Réunion qui n'est pas exploité. Une étude descriptive des procédés de transformation mis en œuvre à Madagascar (Weil et al., 2014), a été effectuée sur *Tsperifery*, nom vernaculaire donné aux espèces de poivres sauvages de la Grande Ile, qui elles, sont largement exploitées.

## 1.2 Les critères de qualité du poivre

La qualité du poivre est essentiellement évaluée selon sa qualité sensorielle. Celle-ci est définie par l'arôme, le goût et l'aspect visuel qui peuvent être estimés à travers la teneur en certains composés d'intérêts.

### 1.2.1 L'arôme

L'huile essentielle de poivre se localise dans le mésocarpe interne du fruit. Elle se présente généralement sous la forme d'un liquide transparent tirant légèrement sur le vert à l'odeur de poivre très prononcée mais sans caractère brulant (Pham, 2007). C'est un liquide hydrophobe concentré en arômes volatiles qui peut contenir, en fonction du produit, un nombre important de composés. Ces composés sont pour la plupart, des molécules peu complexes, tels que les

monoterpènes, ou des terpènes plus complexes, dont les sesquiterpènes ainsi que des phénylpropanoïdes. L'huile essentielle de poivre est utilisée par les industries de la parfumerie principalement dans la fabrication d'eau de toilette, mais aussi dans l'industrie alimentaire comme exhausteur de goût. Les arômes (et donc l'huile essentielle) influencent l'odorat et le goût.

### **1.2.2 Le piquant**

Le piquant, qui influence notamment le goût du poivre est principalement conféré par la pipérine qui est un alcaloïde. Sa synthèse se fait à partir d'une enzyme : la pipérottransférase qui catalyse l'amidification de l'acide pipérique sous forme de co-enzyme A, et de la pipéridine (Geisler and Gross, 1990).

De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées à la pipérine qui est reconnue comme antimicrobienne et anti-oxydante (Zarai et al., 2013), hépato-protectrice (Bae et al., 2011) ainsi que présentant un fort potentiel anti-cancéreux (Hwang et al., 2011).

### **1.2.3 La couleur**

La couleur est un critère important dans l'appréciation des aliments, l'aspect visuel détermine en effet la première impression du consommateur. Le *Piper borbonense* mature possède une couleur rouge appréciée par les consommateurs et malheureusement également par les oiseaux. Si l'on trouve des polyphénols dans ce poivre, on ne trouve pas d'anthocyanes, ce qui laisse à penser que sa couleur rouge lui est conférée par des caroténoïdes. Si le lycopène (responsable notamment du rouge de la tomate) n'a pas été identifié dans le *Piper borbonense*, le beta carotène l'a été (résultats non publiés). D'autres caroténoïdes peuvent conférer une couleur rouge tel que la capsantine, capsorubine et capsine ou encore la zeaxanthine et curcubitaxanthine (Deli, 2001) mais aussi la lutéine (Crozier et al., 2006).

## **1.3 Facteurs influençant la qualité du poivre**

Aujourd'hui la qualité du poivre reste un des critères de différenciation sur le marché. Parmi les critères influençant cette qualité, la couleur, le piquant (teneur en pipérine) et l'arôme (teneur et composition en huile essentielle) sont fréquemment cités. Il a été montré que ces caractéristiques physico-chimiques dépendent de plusieurs facteurs tels que l'espèce, les

conditions climatiques ou encore le terroir (Genest et al., 1963 ; Jose&Nambiar, 1972 ; Lewis et al, 1969 ; Mathai, 1981 ; Mathai, Kumaran & Chandy, 1981 ; Nambudiri et al., 1970 ; Purselove et al., 1981). Les procédés de transformation (Weil et al., 2014) et la maturité influencent eux aussi cette qualité, notamment la couleur.

### 1.3.1 Les procédés de transformation du poivre

À Madagascar il existe deux types de transformation décrites par Weil et al. (2014) dites voie sèche et voie humide (Figure 1).

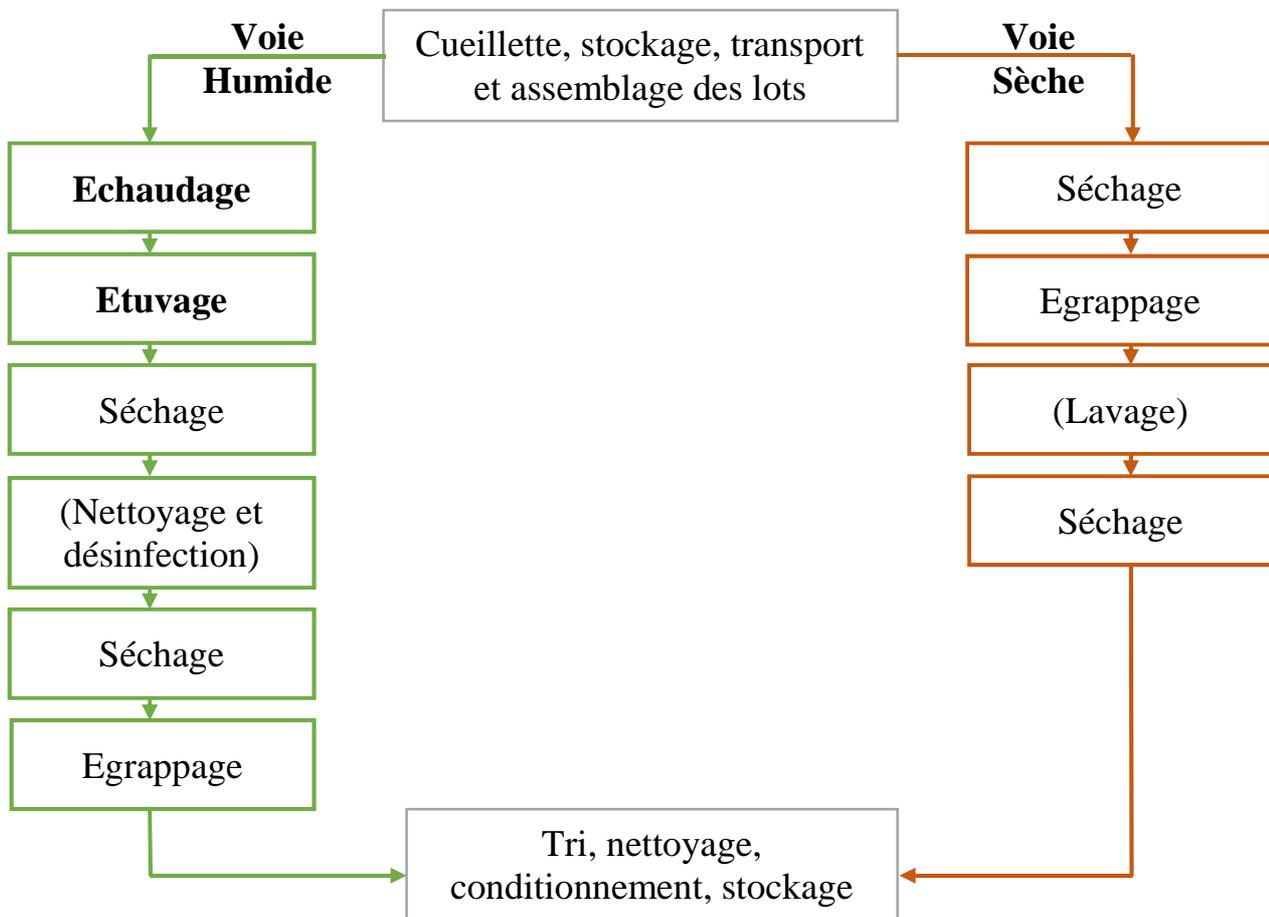


Figure 1 : Procédés de transformation du poivre à Madagascar (d'après Weil et al., 2014)

La voie humide se distingue essentiellement de la voie sèche par les opérations d'échaudage et d'étuvage. L'échaudage consiste à plonger le poivre quelques minutes dans de l'eau frémissante. Elle permet de diminuer la charge microbienne du poivre et d'augmenter la vitesse de séchage. L'étuvage consiste à mettre, dès la sortie d'échaudage, le poivre dans une atmosphère confinée et saturée en eau.

La voie sèche est plus simple à mettre en œuvre et semble mieux respecter le produit (notamment la couleur) que la voie humide. Le séchage, étape commune aux deux voies, permet de ramener la teneur en eau du poivre à des valeurs comprises entre 10 et 15% afin d'assurer la qualité sanitaire et la conservation du produit.

### **1.3.2 La maturité du poivre**

Les grains de poivres, portés par des grappes, sont verts à leur apparition et prennent une couleur rouge à pleine maturité. La fructification du poivre, au sein d'un bassin considéré, s'étale sur plusieurs semaines (entre août et novembre dans notre zone de collecte de la Réunion). Toutes les grappes d'une liane considérée n'arrivent pas à maturité au même moment alors que la maturité des grains au sein d'une même grappe s'étale également. À Madagascar, où les pratiques de cueillette consistent à couper la liane (avec abattage ou non du tuteur), l'intégralité des grappes d'une même liane est collectée au même moment, conduisant de fait à une très grande hétérogénéité des grains. Dans la perspective de mise en œuvre d'une filière (malgache et/ou réunionnaise) basée sur du poivre en culture, on peut imaginer qu'il sera possible de sélectionner les grappes sur une liane mais pas les grains sur une grappe, car cela représenterait un travail trop fastidieux. Quoi qu'il en soit, dans le contexte actuel et pour le futur, il est important d'étudier l'impact de la maturité sur la qualité du poivre.

Peu de travaux ont jusqu'alors été réalisés sur ce sujet et les résultats présentés par Rathnawathie and Buckle (1984), par Mathai (1981) et par Jansz, Balachandran, Packiyasothy, and Ratnayake (1984) ont été obtenus sur du poivre noir (*Piper nigrum*) cultivé. Notre étude vise à déterminer l'impact de la maturité sur la qualité du poivre sauvage de la Réunion.

## 2. Etude de l'impact de la maturité sur la qualité du poivre

### 2.1 Résumé et mots clefs

Le poivre sauvage de La Réunion, *Piper borbonense*, caractérisé par son profil aromatique, son léger piquant et sa couleur rouge, présente un fort potentiel jusqu'à maintenant peu exploité. Cette étude avait pour but de mesurer l'impact de la maturité de ce poivre sur les critères de qualité suivants : teneur en pipérine, teneur et composition en huile essentielle et couleur. Pour cela, nous avons travaillé sur 3 maturités A, B et C, distinctes visuellement et correspondant à des dates de cueillettes différentes. Les mesures ont été réalisées sur du poivre frais et séché, c'est-à-dire prêt à consommer, afin de tenir compte de l'éventuelle influence de la structure des grains (qui évolue selon la maturité) sur le devenir des composés d'intérêts au cours du procédé. Des analyses sensorielles ont également été réalisées. Les résultats obtenus ont montré que le poivre de maturité A semblait avoir atteint son potentiel aromatique maximum. Au-delà de ce stade, les teneurs en pipérine et en huile essentielle mais aussi en pipérine diminuaient dans les poivres frais et transformés. Les compositions aromatiques sont globalement peu impactées par la maturité et les procédés. Inversement, la couleur augmentait au cours de la maturité mais était fortement impacté par le procédé de séchage, et cela quelle que soit la maturité. Au niveau sensoriel, les quelques différences perçues, se sont révélées difficiles à corrélérer avec les variations biochimiques.

A l'échelle d'une filière, la récolte des grains immatures, possédant les teneurs les plus élevées en composés d'intérêt, ne satisfierait pas les besoins en termes de rendements de production.

En conclusion, il s'avère plus pertinent de cueillir le poivre lorsqu'il est mature afin de répondre aux exigences de rendement tout en conservant des teneurs en composés d'intérêts satisfaisantes ainsi qu'une belle couleur rouge après procédé.

Mots clefs : poivre, maturité, pipérine, huile essentielle, composés aromatiques, couleur, qualité sensorielle.

## 2.2 Introduction

Le poivre, longtemps considéré comme le roi des épices par son pouvoir aromatique, est originaire de la côte de Malabar en Inde. Aujourd'hui il est cultivé dans de nombreuses régions tropicales. Le monde compte environ 700 espèces de poivre (Sumathykutti et al., 1999 ; Weil et al., 2014) parmi lesquelles le *Piper nigrum*, avec plus de 450 000 tonnes par an (FAO Statistics Division, 2015), est de très loin la plus produite au monde. Cependant grand nombre d'entre elles sont des espèces sauvages, donc non cultivées. C'est le cas de plusieurs espèces malgaches et d'une espèce de la Réunion : le *Piper borbonense*. Si le poivre sauvage de la Réunion n'est pas (encore) exploité, en revanche plusieurs dizaines de tonnes (en sec) sont exportées, chaque année, depuis Madagascar vers l'Europe et l'Amérique du Nord. Ces poivres sauvages sont très prisés et reconnus pour leur qualité ; cependant celle-ci est souvent perçue comme hétérogène et aurait même tendance à baisser globalement ces dernières années. Plusieurs paramètres peuvent influencer cette qualité, parmi lesquels l'espèce, le terroir, le climat, les conditions de culture, la maturité à la cueillette ou encore les pratiques post-récolte jusqu'au mode de consommation. La présente étude vise à étudier l'influence de la maturité (à la cueillette) sur la qualité du *Piper borbonense* frais et transformé. Peu de travaux ont été réalisés jusqu'alors sur ce sujet et les résultats présentés par Rathnawathie and Buckle (1984), par Mathai (1981) et par Jansz et al. (1984) ont tous été obtenus sur du poivre noir (*Piper nigrum*) cultivé.

Dans notre étude, la qualité a été évaluée à travers le piquant (teneur en pipérine), l'arôme (teneur et composition en huile essentielle), la couleur et l'analyse sensorielle du poivre.

## 2.3 Matériels et méthodes

### 2.3.1 Collecte, préparation et conservation des échantillons

Le poivre a été collecté sur une zone peu étendue (moins de 300 m de distance entre les 3 lianes) à la Rivière Langevin, tout au Sud de La Réunion.

Trois cueillettes successives, espacées d'un mois environ et correspondant à trois maturités distinctes A, B, C, ont été réalisées sur trois lianes différentes (Tableau 1).

Tableau 1 : Collecte des échantillons sur les lianes 1, 2 et 3

	Maturité		
	A	B	C
Couleur	Vert	Orange	Rouge
Date de récolte	01/07/2015	12/08/2015	02/09/2015

Des lots moyens ont ensuite été constitués à partir des trois lianes pour chaque maturité (Figure 2). Les échantillons ont enfin été congelés à -80°C (Congélateur Froilabo- Bio Memory 690 litres).

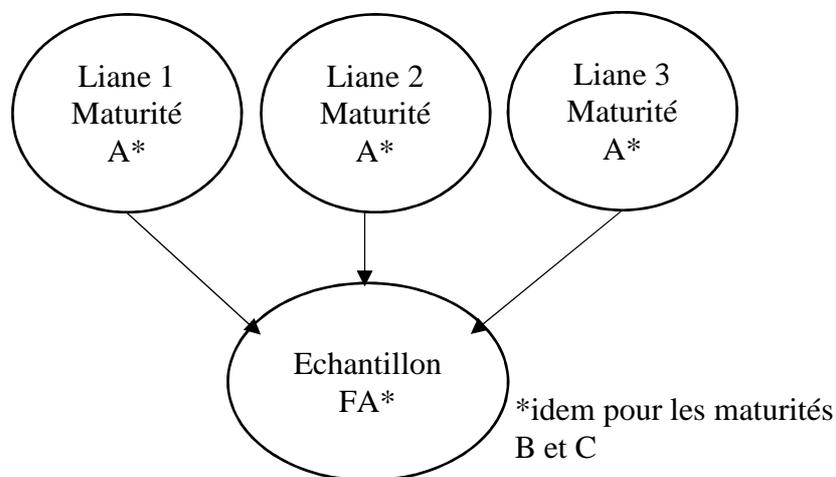


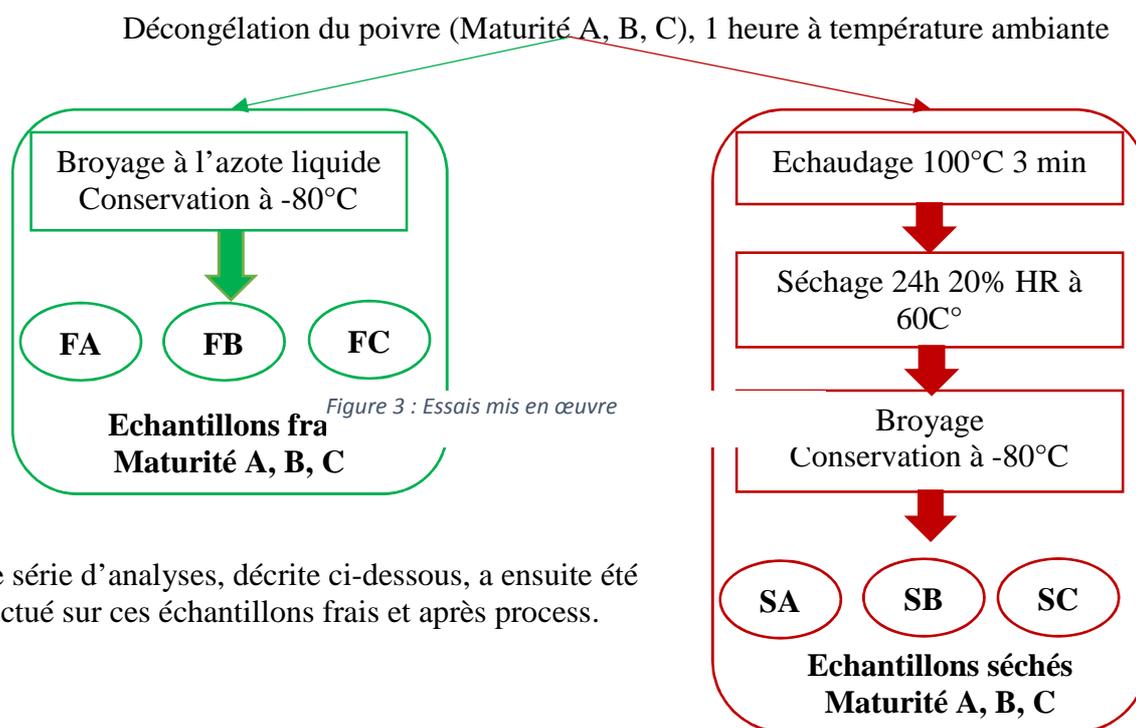
Figure 2 : Constitution de lots moyens à partir de trois lianes pour chaque maturité

Pour des raisons d'hétérogénéité de la maturité des grains au sein d'une même grappe, le lot de maturité A contenait une certaine proportion (environ 20%) de grains à maturité B tout comme le lot B contenait des grains à maturité A et C et le lot C des grains à maturité B. Pour autant, pour que notre étude soit représentative de la réalité et parce que l'on sait qu'un tri (par grains au sein d'une grappe) ne serait pas réaliste dans le cadre d'une filière, les lots A, B et C sont laissés tels quels.



### 2.3.2 Traitement du poivre

Dans la mesure où le poivre est consommé transformé (au minimum séché), et parce que la structure du grain, qui évolue au cours de la maturité peut avoir un impact sur le devenir des composés d'intérêts au cours du procédé, les échantillons frais (FA, FB et FC) ont été transformés selon un procédé standard en échantillons séchés (SA, SB et SC). C'est en effet l'influence de la maturité sur la qualité des poivres frais et transformés qui nous intéresse. Le procédé mis en œuvre était composé de deux opérations unitaires : un échaudage à 100 °C pendant 3 min dans un bain marie (Memmert GmbH type WB 22 Schwabach, Germany) ainsi qu'un séchage à 60°C pendant 24h à 20% HR dans une enceinte climatique (Figure 3). Les échantillons ont été broyés (Retsch– Grindomix GM200, Retsch GmbH, Germany) à 10000 rpm pendant 10 secondes.



Une série d'analyses, décrite ci-dessous, a ensuite été effectuée sur ces échantillons frais et après process.

### 2.3.3 Détermination de la teneur en pipérine

La teneur en pipérine, exprimée en base sèche, a été déterminée selon la méthode décrite dans la norme ISO-5564 (International Standard Organization, 1982). Le spectrophotomètre utilisé est un Thermospectronic Helios alpha v4.60 (Thermo Fisher Scientific, USA). L'écart-type relatif était de 3,32% (n=3).

### 2.3.4 Détermination de la teneur en huile essentielle

La teneur en huile essentielle, exprimée en base sèche, a été déterminée selon une méthode adaptée de la norme standard ISO 6571 (International Standard Organization, 2008). La seule modification par rapport à la méthode standardisée réside dans le fait que nous n'avons pas employé de xylène dans notre protocole. L'écart-type relatif était de 2,08 % (n=3).

### **2.3.5 Identification et détermination de la composition des huiles essentielles**

#### **2.3.5.1 Séparation sur colonne apolaire**

Les composés volatiles ont été analysés sur une CG (HP 6890), équipée d'une colonne apolaire SPB-5 (Supelco- 60m x 320 µm x 0,25 µm) et couplée à un détecteur SM. Des aliquotes (0,2 µL) d'huile essentielle obtenue comme décrit en 2.3.4, ont été injectés avec un split (1 : 50). La température de l'injecteur était de 250°C. La température de la ligne de transfert était de 250°C et le débit du gaz vecteur (hélium) était de 0,7 mL/min. La température du four était programmée comme suit : température initiale de 60°C, augmentation de 4°C/min jusqu'à atteindre une température finale de 250°C maintenue pendant 50 min. Les molécules ont été identifiées par CG/SM avec une source d'ionisation électronique (70eV). Les masses des composés étaient comprises entre 20 et 400 m/z.

#### **2.3.5.2 Séparation sur colonne polaire**

Les composés volatiles ont été analysés sur une CG (HP 6890), équipée d'une colonne apolaire Supelco-Wax (Supelco- 60m x 320 µm x 0,25 µm) et couplée à un détecteur SM. Des aliquotes (0,1 µL) d'huile essentielle, obtenus comme décrit en 4.3.4, ont été injectés avec un split (1 : 30). La température de l'injecteur était de 250°C. La température de la ligne de transfert était de 250°C et le débit du gaz vecteur (hélium) était de 0,8 mL/min. La température du four était programmée comme suit : température initiale de 60°C, augmentation de 4°C/min jusqu'à atteindre une température finale de 230°C maintenue pendant 20 min. Les molécules ont été identifiées par CG/SM avec une source d'ionisation électronique (70eV). Les masses des composés étaient comprises entre 25 et 350 m/z.

#### **2.3.5.3 Identification**

Les composés aromatiques séparés sur les deux colonnes, ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse à ceux disponibles dans les bases de données

commerciales (NIST02, WILEY) ou constitués par nos soins et en comparant les indices de rétention calculés à ceux de la littérature (Adams, 1995; Jennings & Shibamoto, 1980; Kondjoyan & Berdagué, 1996).

#### **2.3.5.4 Quantification sur colonne apolaire**

Les composés aromatiques ont été quantifiés sur une CG (HP 5890), équipée d'une colonne apolaire SPB-5 (Supelco- 60m x 320 µm x 0,25 µm) et couplée à un détecteur FID. Des aliquotes (0,3 µL) d'huile essentielle de chaque échantillon, obtenus comme décrit en 2.3.4, ont été injectés avec un split (1 :33) en CG-FID pour chaque échantillon. Le débit du gaz vecteur (hélium) était de 0,7 mL/min. La température de l'injecteur était de 250°C. La température du four était programmée comme suit : température initiale de 60°C, augmentation de 4°C/min jusqu'à atteindre une température finale de 250°C maintenue pendant 20 min. Les quantifications ont été réalisées par rapport à une gamme étalon de terpinolène utilisée comme étalon externe. L'écart-type relatif était de 0,43% (n=3).

#### **2.3.6 Mesure de la couleur**

Les mesures de la couleur ont été réalisées sur les échantillons en grains, avec un Minolta CR-400 et son logiciel. Pour chaque échantillon frais et séché (FA, FB, FC, SA, SB, SC), disposé en couche de 1 cm de poivre dans une boîte de Pétri découverte, la mesure était répétée dix fois. Les écarts-type relatifs étaient respectivement de 0,93%, 2,68% et 4,79% pour les valeurs L\*, a\*, b\* (n=10).

#### **2.3.7 Evaluation sensorielle**

Afin d'évaluer l'impact de la maturité au niveau sensoriel, les échantillons séchés (SA, SB, SC) ont été soumis à l'analyse sensorielle dans un laboratoire dédié. Un jury averti, de 12 personnes, a été sélectionné et entraîné selon la norme ISO 8586-1. Lors des entraînements des descripteurs ont été retenus pour l'élaboration des profils sensoriels des produits selon les normes ISO 11035 et ISO 5492. Des tests triangulaires et de classement, olfactifs et gustatifs sur du poivre en grains et en mouture, ont été réalisés respectivement selon les normes ISO 4120 et ISO 8587 à l'aide du logiciel Tastel+ Version 2015.

#### **2.3.8 Détermination de la teneur en matière sèche**

La teneur en matière sèche a été déterminée par séchage de 3g de poivre broyé à 105°C pendant 30h (jusqu'à masse constante) dans une étuve de laboratoire (ULE 400, Memmert GmbH, Germany). Les masses initiale et finale ont été déterminées à l'aide d'une balance de précision (Scaltec SBC 22 model, Scaltec GmbH, Germany). Les valeurs obtenues sont utilisées pour rapporter les teneurs en huile essentielle et pipérine en base sèche. L'écart-type relatif était 0,55% (n=3).

### 2.3.9 Traitements statistiques

Les différences entre les moyennes de teneur en pipérine, de teneur en huile essentielle, de compositions aromatiques des huiles essentielles et de valeurs chromatiques L\*, a\*, b\* ont été évaluées par des analyses de la variance (ANOVA) ; les différences significatives entre les échantillons ont été déterminées par un test de Tukey avec un seuil de significativité < 0,05. Les tests triangulaires et de classement ont été traités respectivement selon les méthodes décrites dans les normes ISO 4120 et 8587 par le logiciel Tastel+ Version 2015 ( $\alpha=0,05$ ).

## 2.4 Résultats

Les teneurs en pipérine et en huile essentielle ont été mesurées sur les échantillons de poivre pour les trois maturités A, B et C. Ces déterminations ont été réalisées sur le poivre frais ainsi que sur le poivre après traitement (Tableau II).

Tableau II : Impact de la maturité sur les teneurs moyennes (n=3) de pipérine et d'huile essentielle pour 100 g de poivre (bs). F : frais ; S : Sec. Les valeurs avec des lettres différentes (a-e) sont significativement différentes (Test de Tukey, P<0,05)

Echantillon	Teneur en	
	Pipérine (g.100g <sup>-1</sup> bs)	Huile essentielle (mL.100g <sup>-1</sup> bs)
FA	0,32 ± 0,03 <sup>a</sup>	16,48 ± 0,84 <sup>a</sup>
FB	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	13,49 ± 0,43 <sup>b</sup>
FC	0,21 ± 0,00 <sup>d</sup>	12,83 ± 0,40 <sup>bc</sup>
SA	0,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	12,63 ± 0,44 <sup>c</sup>
SB	0,20 ± 0,01 <sup>de</sup>	10,98 ± 0,36 <sup>d</sup>
SC	0,18 ± 0,01 <sup>e</sup>	10,41 ± 0,78 <sup>d</sup>

± intervalles de confiance à 95%

#### 2.4.1 Impact de la maturité sur la teneur en pipérine

Pour le poivre frais, la teneur en pipérine diminue de 28% de la maturité A vers B (FA/FB) et de 10% de la maturité B par rapport à C (FB/FC). Le process engendre des pertes de 20 % pour le poivre de maturité A (FA/SA) et d'environ 13% pour les maturités B et C (FB/SB, FC/SC). Le poivre (SA) de maturité A possède 25% de pipérine en plus que le poivre (SB) de maturité B. SB et SC ne sont pas significativement différents entre eux.

#### 2.4.2 Impact de la maturité sur la teneur en huile essentielle

Pour le poivre frais, la teneur en huile essentielle diminue de 18% de la maturité A par rapport à la maturité B (FA/FB). La diminution de la maturité B par rapport à la maturité C (FB/FC) n'est pas significative.

Le process engendre des pertes de 23% pour le poivre de maturité A (FA/SA) et de 18% pour les maturités B et C (FB/SB, FC/SC). Le poivre (SA) de maturité A possède 13% d'huile essentielle en plus que le poivre (SB) de maturité B. SB et SC ne sont pas significativement différents entre eux.

#### 2.4.3 Impact de la maturité sur la composition en huile essentielle

La CG-SM réalisée sur un échantillon moyen, représentatif de nos 6 échantillons, a permis d'identifier 24 composés aromatiques présents à plus de 0,5% (v/v), représentant 91% (v/v) de l'huile essentielle totale. 18 d'entre eux, présents dans chacun des 6 échantillons, et représentant 84% (v/v) de l'huile essentielle, ont été quantifiés. La concentration de ces 18 composés dans le poivre frais maturité C est donnée dans le tableau III.

Tableau III : Teneur des composés aromatiques quantifiés dans l'huile essentielle de l'échantillon FC (n=3)

Composés aromatiques	% (v/v) sur total d'huile essentielle
Limonène	22,6
Asaricin	11,9
Alpha-phellandrène	10,6
Delta-3-Carène	8,5
Beta-pinène	5,3
Alpha-pinène	4,0
Safrol	3,3
Dilapiole	4,8
Alpha-guaiène	2,9
Delta-elemène	2,0
Bêta-myrcène	1,9
Elemicine	2,0

Camphène	1,2
Méthyl-eugénol	0,7
Germacrène-D	0,6
Alpha-cubébène	0,5
Sabinène	0,5
Terpinolène	0,5
Total	84,0

±intervalles de confiance à 95% < 0,001

Quatre composés représentent à eux seuls 54 % du total de l'huile essentielle : le limonène (23%), l'asaricin (12%), l'alpha phellandrène (11%) et le delta-3-Carène (8%). Ils sont majoritaires quelle que soit la maturité considérée et cela en frais comme après process.

De la maturité A vers B (FA/FB) ces composés diminuent et expliquent en bonne partie, du fait de leur proportion importante, les pertes globales. Ainsi, les pertes en limonène représentent, à elles seules, 21% des pertes globales.

Le terpinolène, le safrol, le delta elemene, l'alpha-cubène et l'alpha guaiene sont les plus impactés (à la baisse) par le passage de la maturité A vers la maturité B. Inversement l'alpha phellandrène, le germacrène-D et l'asaricin sont les composés les moins affectés.

De la maturité B vers la maturité C (FB/FC), le sabinène, le safrol, l'asaricin, l'elemecine et le dialopiole subissent les pertes les plus importantes. Les pertes en asaricin représentent, à elles seules, 33% des pertes globales. En revanche le beta-pinène, le camphène, le delta-elemène, l'alpha cubène et le germacrène-D ne sont pas impactés (Figure 4).

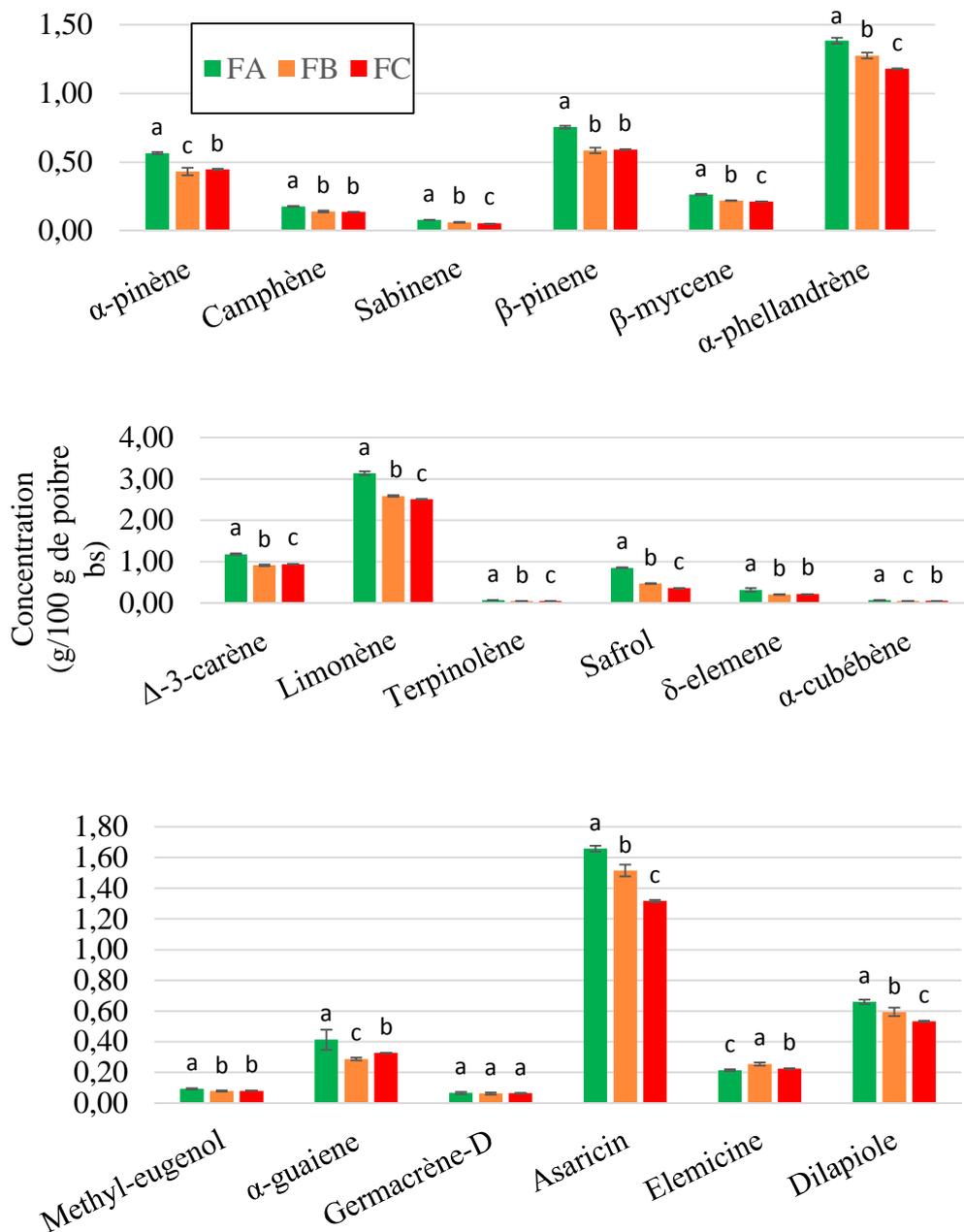


Figure 4 : Evolution quantitative des composés aromatiques en fonction de la maturité ; F : frais (n=3). Les valeurs avec des lettres différentes pour un même composé (a-c) sont significativement différentes (Test de Tukey, P<0,05)

Après transformation, c'est-à-dire après échaudage et séchage, les pertes en limonène représentent 25% des pertes globales pour la maturité A. Le safrol, le sabinène, le terpinolène et l'elemicine sont particulièrement affectés par le process avec des pertes respectives de 48%, 34%, 33% et 28% (FA/SA). Pour la maturité B, les pertes en asaricin au cours du procédé représentent 32% des pertes globales (FB/SB). L'asaricin, l'élémicine et le dilapiole sont particulièrement affectés par le process avec des pertes respectives de 46%, 76% et 70%. Pour la maturité C, les pertes en asaricin après process représentent 16% des pertes globales alors que le safrol l'élémicine et le dilapiole subissent des pertes respectives de 28%, 57% et 55%. (FC/SC). Le germacrène-D, l'alpha cubène, l'alpha guaiene et le methyl eugénol sont les composés les plus résistants au process quelle que soit la maturité considérée (Figure 5).

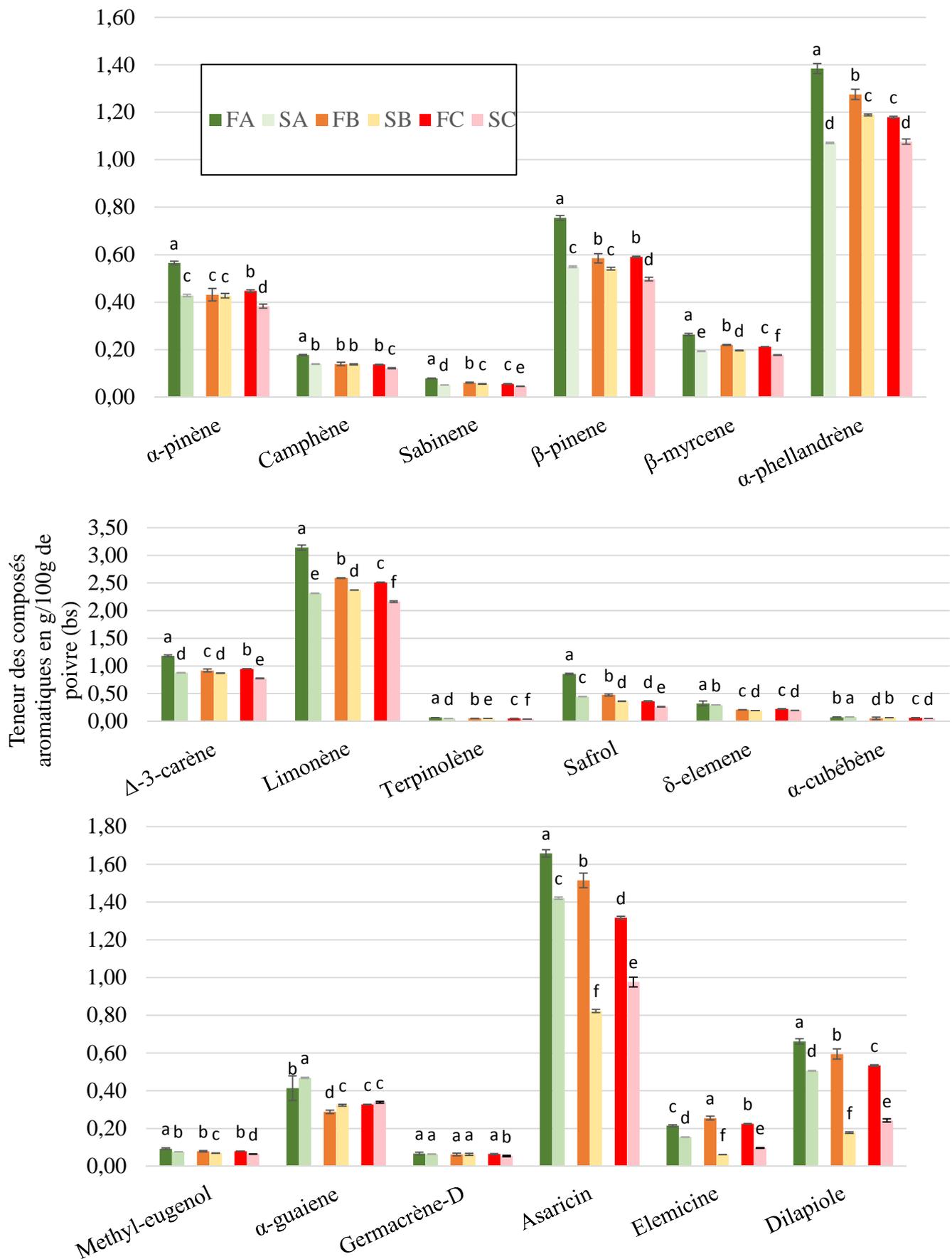


Figure 5 : Evolution quantitative des composés aromatique du poivre en fonction de la maturité et des procédés. F : frais ; S : sec (n=3). Les valeurs avec des lettres différentes (a-f) pour un même composé sont significativement différentes (Test de Tukey, P < 0,05).

#### 2.4.4 Impact de la maturité sur la couleur

Les valeurs chromatiques  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  augmentent au cours de la maturité (FA/FB/FC) (Figure 6). Le process à un impact négatif (toutes valeurs chromatiques affectées à la baisse sauf  $a^*$  pour la maturité A) sur la couleur et cela quelle que soit la maturité (FA/SA, FB/SC, FC/SC). Néanmoins le poivre de maturité C possède les valeurs chromatiques les plus élevés après traitement (SA/SB/ SC).

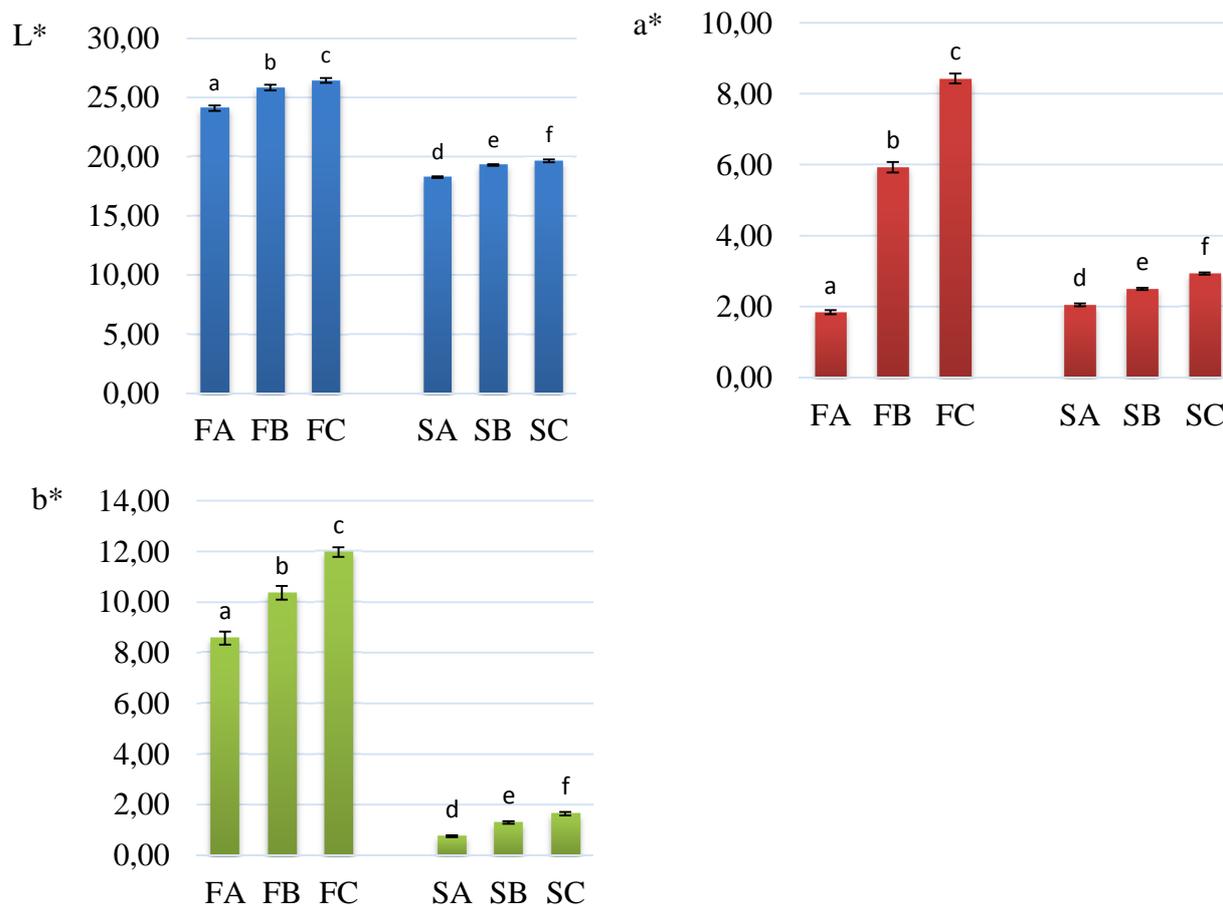


Figure 6 : Impact des procédés et de la maturité sur la couleur ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). F : frais ; S : Sec (n=10). Les valeurs avec des lettres différentes (a-f) sont significativement différentes (Test de Tukey,  $P < 0,05$ )

#### 2.4.5 Impact de la maturité sur la qualité sensorielle

Sur seize tests, quatre de classement et douze triangulaires, deux d'entre eux se sont montrés significatif (Annexe 1). Le test de classement gustatif, sur du poivre moulu s'est avéré significatif. Les rangs 1 2 et 3 ont été respectivement attribués aux poivres de maturité B, A et C. Le poivre de maturité B a été perçu de manière plus intense notamment sur les descripteurs suivants : frais, girofle, muscade, camphre, menthe. Le test triangulaire, gustatif, sur du poivre en grain a montré que les poivres de maturité A et C étaient significativement différents.

Le poivre en grain de maturité C s'est distingué, par des notes aromatiques plus intenses, piquantes et camphrée.

## **2.5 Discussion**

### **2.5.1 Impact de la maturité sur les teneurs en pipérine, huile essentielle et la couleur**

Selon Schweiggert, Mix, Schieber, and Carle (2005), la teneur en huile essentielle est davantage affectée par la maturité que par le procédé. Dans notre étude, l'huile essentielle est autant affectée par la maturité que par les procédés puisqu'on observe (pour le poivre frais) 22% de diminution entre la maturité A et la maturité C et 19% de pertes entre le poivre frais et le poivre sec (pour la maturité C). En revanche la pipérine est, davantage affectée par la maturité que par les procédés puisqu'on observe pour le poivre frais 37% de diminution entre la maturité A et la maturité C et seulement 19% de pertes entre le poivre frais et le poivre sec (pour la maturité C). Le poivre de maturité A subit des pertes plus importantes en pipérine et huile essentielle après process (que B et C). Son péricarpe moins épais, plus fragile et plus perméable que pour les poivres plus matures pourrait expliquer cette plus grande sensibilité au process.

Des travaux réalisés sur le *Piper nigrum* ont montré que les teneurs en pipérine et en huile essentielle augmentaient au cours de la maturité jusqu'à atteindre un maximum, puis diminuaient (C. K Mathai, 1979 ; Errol R. Jansz et al., 1983 ; M. Rathnawathie et K.A Buckle, 1983). Dans notre cas, aucune augmentation de ces teneurs n'est observée ; on constate uniquement une diminution au cours de la maturité. Il est vraisemblable qu'une ou des cueillettes(s) plus précoces (avant notre maturité A) auraient permis d'observer cette phase d'augmentation des teneurs en pipérine et en huile essentielle. Geiler et Gross (1990) ont démontré qu'aucune réaction de synthèse de la pipérine ne se déroulait en cas de dénaturation des protéines. D'autres travaux ont prouvé qu'une irradiation de la pipérine aux UV (340 nm) provoquerait sa transformation en isochavicine (De Cleyn and Verzele, 1972). Ces phénomènes pourraient expliquer, au moins en partie, la diminution de la pipérine au cours de la maturité.

Au cours de la maturité, les valeurs chromatiques L\*, a\*, b\* augmentent, la couleur passant du vert au rouge. Quelle que soit la maturité, la couleur est fortement affectée par le process et

les profils chromatiques s'éloignent beaucoup du poivre à l'état frais. Cependant le poivre de maturité C conserve, après process, une couleur plus rouge, significativement différente des autres maturités. Au cours du séchage on assiste à un brunissement enzymatique mais aussi non-enzymatique du poivre. Le brunissement des polyphénols viendrait masquer la couleur rouge conférée par les caroténoïdes.

La maîtrise des conditions d'échaudage et de séchage s'avère indispensable afin de préserver au mieux cette couleur rouge du *Piper borbonense*. Si un échaudage suffisant devrait permettre de dégrader la PPO et la POD et d'ainsi limiter le brunissement enzymatique, la limitation des réactions de Maillard dépendante du temps, de la température mais aussi de l'Aw s'avère plus complexe.

### **2.5.2 Impact de la maturité sur la composition en huile essentielle**

L'huile essentielle est composée à 66% de monoterpènes (camphène, alpha phelandrène, limonène), de 7% de sesqui-terpènes (a-guaiène, a-cubébène, delta elemène) et à 27% de phénylpropanoïdes (safrol, élemicine, asaricin). De manière générale, une diminution de ces composés est observée au cours de la maturité ainsi qu'au cours du procédé. Parmi nos 3 familles de composés identifiés, ce sont les sesquiterpènes qui sont les plus stables au cours de la maturité (FA vs FC) et les plus résistants au procédé (SA vs SC). La tension de vapeur est inversement proportionnelle à la masse moléculaire. Autrement dit, plus un composé est léger, plus sa tension de vapeur sera élevée et par conséquent plus ce composé sera volatile. Ainsi, les sesquiterpènes de masse moléculaire plus importantes, et donc de tension de vapeur plus faibles, seraient donc plus stables que les monoterpènes.

Au vu des résultats obtenus, il semblerait que le poivre (de couleur verte) de maturité A, aurait atteint un potentiel aromatique au-delà duquel il n'y aurait plus de synthèse de composés aromatiques.

Une augmentation des caroténoïdes (en tout cas de la couleur rouge) et une diminution des teneurs en composés aromatiques sont observées au cours de la maturité. Ces derniers proviennent de deux précurseurs, l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMADP). Il serait possible d'observer une voie de biosynthèse préférentielle des caroténoïdes, qui sont des tetraterpenes, au détriment des autres voies (Figure 7).

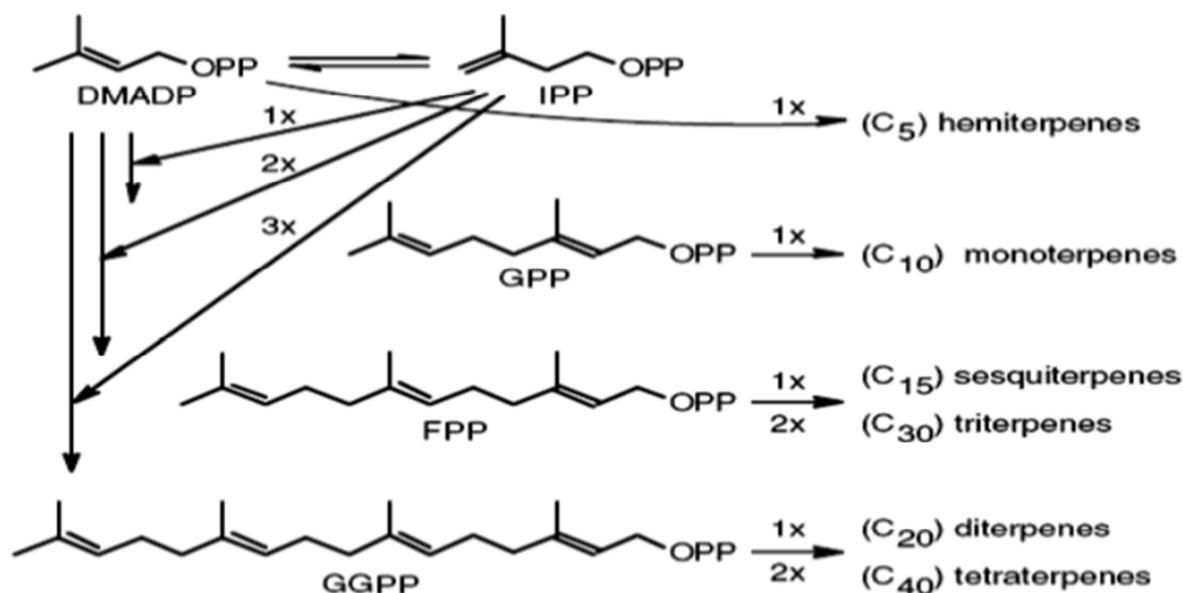


Figure 7 : Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes (modifié d'après Bohlmann & Keeling, 2008)

### 2.5.3 Impact de la maturité sur la qualité sensorielle

Le test de classement a montré que le poivre de maturité B se distinguait des deux autres par ses notes de muscade et de girofle. Les composants de la noix de muscade, sabinène, alpha-pinène, B-pinène, myristicine, limonène et delta-3-carène (Teuscher et al., 2005) sont effectivement présents dans le *Piper borbonense*. Du méthyl-eugénol est également retrouvé, ce qui pourrait expliquer l'impression de girofle. La distinction entre les poivres de maturité C et A du test triangulaire s'est notamment faite sur les descripteurs piquant et le camphre. Contrairement à nos résultats de teneur en pipérine, le poivre de maturité C a été perçu comme plus piquant.

Dans notre composition aromatique nous ne retrouvons pas la molécule caractéristique du camphre, à savoir le camphor. Cependant, selon Richard et al. (1992), c'est l'association de molécules qui engendre une note aromatique, même si certains composés peuvent s'exprimer plus que d'autres.

Il s'avère difficile de corréliser les résultats des tests sensoriels aux teneurs et compositions en huile essentielle et aux teneurs en pipérine. La perception sensorielle ne peut être uniquement reliée aux teneurs en différents composés biochimiques, elle est plus complexe. Les ratios entre certains composés, l'évolution de la matrice, la teneur en caroténoïdes ainsi que le changement de composition de l'amande du poivre au cours de la maturité peuvent également

influencer cette perception. Malgré les dispositions prises, l'aspect visuel des grains, différent pour chaque maturité, peut avoir faussé le jugement du jury lors des tests sur grains. De manière générale les membres du jury ont commenté que les échantillons étaient similaires et que les différences restaient subtiles. Des tests complémentaires mériteraient d'être réalisés afin de confirmer les résultats obtenus.

## **2.6 Conclusion partielle**

Les teneurs en huile essentielle et en pipérine du *Piper borbonense* diminuent au cours de la maturité. Cette différence s'exprime toujours après traitement puisque le poivre séché (A) possède des teneurs plus importantes que les poivres de maturité B et C (qui ne sont pas significativement différents entre eux pour ces critères après process). Cependant à ce stade les grains sont petits et peu nombreux sur grappe ; récolter à cette maturité poserait des problèmes de rendement au sein d'une filière. La composition en huile essentielle est peu impactée par la maturité : on retrouve en effet les mêmes composés et seules les concentrations diminuent de la maturité A vers la maturité C, et ce en frais comme en sec.

Le poivre passe du vert au rouge au cours de la maturité. Le poivre mature (C) est le plus rouge à l'état frais et conserve le mieux sa couleur après séchage.

Au niveau sensoriel, si le poivre de maturité B s'est distingué au test de classement, les tests triangulaires, confrontant les poivres de maturité B et C, n'ont pas révélé de différence significative. Au vu de ces résultats, la cueillette du *Piper borbonense* au stade de maturité (C) semble la plus judicieuse. Ce poivre répond aux enjeux de rendement de production d'une filière, présente des teneurs en pipérine et en huile essentielle satisfaisante, une composition aromatique riche et offre également une belle couleur rouge après procédé.

### **3. Etude de l'inactivation des enzymes lors de l'échaudage**

La couleur rouge du *Piper borbenense* est un critère important, car typique et apprécié des consommateurs, que l'on souhaite préserver après traitement. Comme nous l'avons vu en 1.2.3 deux phénomènes altèrent cette couleur : le brunissement enzymatique et le brunissement non enzymatique. Préserver la couleur passe dans un premier temps par la maîtrise de l'échaudage, afin de réduire l'activité enzymatique.

Le brunissement enzymatique est un véritable problème, cause d'altération dans les filières fruits et de légumes. Les enzymes généralement impliquées sont les polyphénols oxydases (PPO) et les peroxydases (POD) (Toivonen and Brummell, 2008).

Ces enzymes catalysent l'oxydation des polyphénols. La coloration induite par ces derniers résulte de la conversion des composés phénoliques en quinones qui sont ensuite polymérisées en pigment sombre.

Cette étude vise à déterminer les paramètres cinétiques d'inactivation de ces enzymes dans le poivre afin d'identifier les conditions d'échaudage nécessaires. Optimiser le temps et la température de l'échaudage pourrait permettre non seulement de mieux conserver la couleur du poivre mais aussi de préserver le potentiel aromatique et le piquant qui sont eux aussi, comme nous l'avons vu plus haut, sont altérés par le procédé.

## 3.1 Matériels et méthodes

### 3.1.1 Préparation et traitement des échantillons

Différentes cueillettes de poivre de maturité C (rouge), prélevés à différentes dates, et préalablement congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , ont été assemblés en un lot homogène. Des échantillons de 50 g de poivre ont ensuite été plongés dans un bain marie à des temps et des températures différentes (Tableau IV). Immédiatement après traitement les échantillons sont immergés dans de l'azote liquide, puis broyés ( $n=1$ ).

Tableau IV : Matrice expérimentale des couples temps/température.

<b>t (min)</b>						
poivre frais	T=65°C	T=75°C	T=80°C	T=85°C	T=90°C	T=100°C
0	9	1,9	0,1	0,5	0,05	0,1
	19	4,4	0,2	1,1	0,10	0,2
	35	7,9	0,5	2	0,17	0,3
	61	14	1	3	0,33	0,5
	87	20	3	5	0,50	0,7
	114	26	5	6,4	0,67	0,9
		33,8	8	7,5	0,83	1,2
			10		1	
			20			
			40			

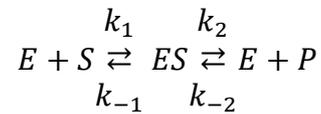
### 3.1.2 Extraction des enzymes et mesure des absorbances par spectrophotométrie

Les polyphénols oxydases et les peroxydases ont été extraites par centrifugation. Ces dernières ont ensuite été mises en contact avec leurs substrats respectifs. Leurs absorbances ont ensuite été mesurées, en fonction du temps, par spectrophotométrie ( $n=1$ ) (Annexe 2).

### 3.1.3 Traitement des résultats

#### Détermination de l'activité enzymatique

Une réaction enzymatique est décrite comme suit :



Avec E l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat, P le produit et  $k_i$  constante de vitesse des réactions.

L'activité enzymatique, notée  $a$ , est caractérisée par la vitesse d'apparition du produit, soit :

$$a = \frac{d[P]}{dt}$$

Équation 1

Graphiquement cela revient à mesurer la pente de la courbe d'absorbance en fonction du temps. Cette pente doit être calculée sur la partie linéaire de la courbe correspondant à la phase stationnaire (Van Boekel, 2008).

#### Détermination des paramètres cinétiques

On considère que la réduction enzymatique suit une cinétique d'ordre 1 soit :

$$\frac{da}{dt} = -ka$$

Équation 2

Avec  $k$  la constante de réaction ( $s^{-1}$ ) et  $a$  l'activité enzymatique. Cette constante  $k$  varie avec la température  $T$  ( $^{\circ}C$ ) d'après la loi d'Arrhenius :

$$k_{\theta} = k_{ref} \exp \left[ -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T_{\theta} + 273,15} - \frac{1}{T_{ref} + 275,15} \right) \right]$$

Équation 3

$k_{ref}$ ,  $E_a$  et  $R$  sont respectivement, la constante de réaction ( $s^{-1}$ ) à la température de référence  $T_{ref}$ , l'énergie d'activation ( $J.mol^{-1}$ ) et la constante des gaz parfait ( $8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$ ).

Le poivre étant de faible dimension, il est supposé que la température est homogène et que le traitement thermique est isotherme

Ainsi, en condition initial  $a(t)=a_0$  pour  $t=0$ , l'équation 2 devient :

$$\frac{a}{a_0} = \exp(-kt)$$

Équation 4

Ici l'activité initiale ( $a_0$ ) est celle de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement (poivre frais).

La température de référence correspond au milieu du domaine étudié soit :

$$T_{Ref} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n T_i$$

Les valeurs cinétiques,  $k$ ,  $k_{ref}$ ,  $E_a$ , ont été estimées en minimisant la somme des carrés des écarts entre les valeurs mesurées et prédites à l'aide d'une macro sous Excel. Cette méthode permet d'estimer des valeurs plus précises qui s'adaptent mieux au modèle d'Arrhenius.

L'inactivation enzymatique peut-être caractérisée par la durée de réduction décimale  $D$ .

La durée de réduction décimale, temps permettant de réduire de 90 % l'activité enzymatique, est définie par la relation suivante :

$$D_{ref} = \frac{\ln(10)}{k_{ref}}$$

Équation 5

En d'autres termes, c'est le temps nécessaire pour réduire d'un facteur 10 l'activité enzymatique à une température de référence.

$z$  est l'augmentation de la température requise pour entraîner un temps de réduction décimale  $D$ , soit :

$$z = \frac{\ln(10) \times R \times T_{ref}^2}{E_a}$$

En connaissant  $z$  et  $D_{ref}$ , il est possible de calculer  $D$  pour toutes les températures par la relation suivante :

$$D_\theta = D_{ref} \times 10^{-\frac{T_\theta - T_{ref}}{z}}$$

## 3.2 Résultats et Discussion

### 3.2.1 Réduction de l'activité enzymatique

Aux faibles températures du domaine ( 65°C-80°C) on constate une réduction de l'activité enzymatique jusqu'à atteindre une certaine résistance. A 75°C,  $\frac{a}{a_0}$  passe de 1 à 0,2 en 8 min, puis reste aux alentours de 0,1 (Annexe 3). La réduction totale n'est jamais atteinte à ces températures, malgré des temps de traitement longs (120 min à 65°C) . À ces températures la réduction enzymatique ne semble pas suivre une cinétique d'ordre 1. En effet les représentations logarithmiques de  $\frac{a}{a_0}$ , supposées suivre une régression linéaire, possèdent des coefficients de détermination faible ( $R^2$  compris entre -1,75 et 0,52) ( Figure 8).

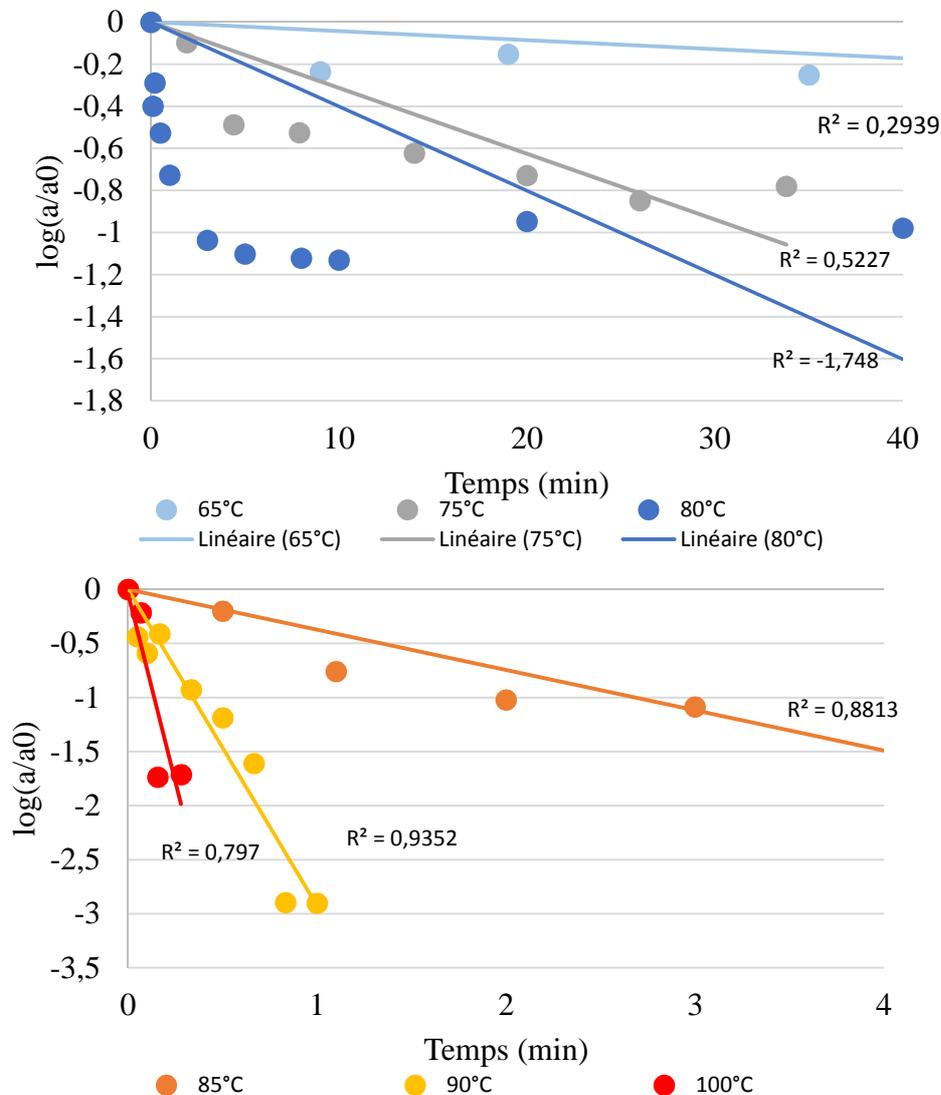


Figure 8 : Représentation logarithmique de la réduction de l'activité enzymatique (POD), en fonction du temps à 65,75, 80 , 85, 95 et 100°C

Ce phénomène est aussi bien observé pour la POD que pour la PPO (Annexe 4).

La réduction enzymatique aux températures plus élevées (85°C-100°C) semble suivre une cinétique d'ordre 1, avec un  $R^2$  compris entre 0,80 et 0,93. Les activités enzymatiques diminuent au cours du temps jusqu'à réduction totale, à 85°C la totalité des enzymes ont été dénaturées après 5 minutes d'échaudage.

Les résultats aux faibles températures du domaine pourraient s'expliquer par la présence d'isoenzymes thermo-résistantes. Les isoenzymes sont des formes multiples d'enzymes provenant d'une modification génétique de la structure primaire de la protéine et catalysant une même réaction pour un organisme donné. Elles présentent habituellement des paramètres cinétiques différents. Dans notre cas, ces isoenzymes résisteraient à des températures inférieures à 85°C. Selon Cruz et al. (2006) le système enzymatique des peroxydases dans le cresson serait composé de fractions thermolabiles et thermo-résistantes. Rudra et al. (2008) ont montré que l'inactivation de la POD entre 80 et 90°C, dans les feuilles de coriandre, suivait un modèle à deux phases ayant différentes constantes de réaction. L'écart par rapport à la cinétique d'ordre 1 à été justifié par la présence d'isoenzymes possédant différentes stabilités thermiques.

Compte tenu des résultats, les données à 65°C, 75°C et 85°C n'ont pas été conservées pour la détermination des paramètres cinétiques.

### 3.2.2 Paramètres cinétiques

Les constantes cinétiques ont été calculées pour chaque température (Tableau V).

Tableau V : Constantes cinétiques PPO POD déterminées aux différentes températures

	<b>PPO</b>	<b>POD</b>
T (C°)	k (s <sup>-1</sup> )	k (s <sup>-1</sup> )
85	0,036	0,027
90	0,061	0,093
100	0,38	0,145

Pour plus de précision, les paramètres  $k_{ref}$  et  $E_a$  ont été déterminés par ajustement de toutes les données brutes au modèle d'Arrhenius (Tableau VI).

L'énergie d'activation de la POD (176 kJ.mol<sup>-1</sup>) (Tableau VI) dans le poivre est proche de celle trouvée par Serrano-Martínez et al. (2008) pour le poivron (151 kJ.mol<sup>-1</sup>) et dans le

melon ( $160 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) (Chisari et al., 2007) mais inférieure aux valeurs dans le raisin ( $271 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) (Fortea et al., 2009).

Tableau VI : Constantes cinétiques et énergies d'activation de la PPO et de la POD

		PPO		POD	
T (C°)	T <sub>ref</sub> (C°)	k <sub>ref</sub> (s <sup>-1</sup> )	Ea (kJ.mol <sup>-1</sup> )	k <sub>ref</sub> (s <sup>-1</sup> )	Ea (kJ.mol <sup>-1</sup> )
85-100	90	0,082	176,2	0,049	125,8

A partir des résultats du tableau VI, les paramètres  $z_{\text{ref}}$  et  $D_{\text{ref}}$  ont pu être calculés (Tableau VII). Pour la PPO, la durée de réduction décimale, à la température de référence, est de 0,47 min. Ce temps est de 0,79 min pour la POD, qui est donc plus résistante ( $D_{\text{ref POD}} < D_{\text{ref PPO}}$ ).

Tableau VII : Paramètres d'inactivation de la PPO et de la POD

		PPO		POD	
T (C°)	T <sub>ref</sub> (C°)	D <sub>ref</sub> (sec)	z (°C)	D <sub>ref</sub> (sec)	z (°C)
85-100	90	28	14,3	48	20,1

Pour atteindre une durée de réduction décimale de 5 min, la température à appliquer est de  $75,3^{\circ}\text{C}$  pour la PPO et  $73,9^{\circ}\text{C}$  pour la POD. Pour la POD, cette valeur est supérieure à celle trouvée par Serrano-Martínez et al. (2008) pour le poivron ( $45^{\circ}\text{C}$ ). Cette enzyme serait donc plus thermostable dans le poivre que dans le poivron, mais moins que dans la pomme de terre et la carotte ( $80^{\circ}\text{C}$ ) (Anthon and Barrett, 2002).

L'augmentation de température requise pour réduire une activité enzymatique de 90%, est généralement comprise entre 10 et  $20^{\circ}\text{C}$ . Les valeurs de  $z$  calculées pour la PPO et la POD du poivre sont comprises dans cette gamme de température.

L'échaudage n'étant pas une opération unitaire limitante, une température de traitement de  $100^{\circ}\text{C}$  est préconisée, ne nécessitant donc pas de thermo-contrôle. En utilisant le modèle établi, et en considérant qu'une réduction totale de l'activité enzymatique correspond à  $2D_{100^{\circ}\text{C}}$ , un échaudage à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes suffirait pour inactiver la PPO et la POD dans le poivre.

Cette étude a permis d'estimer les valeurs cinétiques des enzymes dans le poivre et par conséquent d'identifier d'un barème d'échaudage optimal à leur inactivation. Cependant des essais supplémentaires s'avèrent nécessaire afin de s'assurer de la véracité de ces résultats.

## Conclusion générale

Cette étude a montré qu'au stade de maturité A, le Piper borbonense, poivre sauvage de La Réunion, semble avoir atteint un maximum concernant les teneurs en huile essentielle et en pipérine qui diminuent après ce stade. Cependant, au stade de maturité C, le poivre répond mieux aux enjeux de rendement de production d'une filière, avec des teneurs en pipérine et en huile essentielle satisfaisante, une composition aromatique riche et une couleur rouge bien marquée.

Mais cette couleur est largement impactée par le procédé. Au cours du séchage on assiste à un brunissement enzymatique et aussi à un brunissement non-enzymatique du poivre. L'échaudage, opération clef dans le procédé de fabrication, permet de laver et de diminuer la charge microbienne du poivre et d'augmenter la vitesse du séchage (qui suivra). Il réduit également les activités de la PPO et de la POD, responsables du brunissement enzymatique. Un échaudage à forte température pendant une courte durée engendre leur dégradation (100°C pendant 30 secondes).

Si cet échaudage permet de limiter le brunissement enzymatique, la limitation des réactions de Maillard, dépendante de la température mais aussi de l'Aw, s'avère plus complexe.

Ces mécanismes de dégradation de la couleur doivent être maîtrisés afin de préserver au mieux la belle couleur rouge du Piper borbonense.

## Bibliographie

- Adams, R. P. (1995). *Identification of essential oil components by chromatography /quadrupole mass spectrometry* Carol Stream, Illinois, USA, : Allured Publishing Corporation.
- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2002. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4119–4125.
- Bae, G.-S., Kim, M.-S., Jeong, J., Lee, H.-Y., Park, K.-C., Koo, B.S., Kim, B.-J., Kim, T.-H., Lee, S.H., Hwang, S.-Y., Shin, Y.K., Song, H.-J., Park, S.-J., 2011. Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 382–388. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.136
- Chisari, M., Barbagallo, R.N., Spagna, G., 2007. Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon. *J. Agric. Food Chem.* 56, 132–138.
- Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, I.B., Marks, S.C., Saltmarsh, M., Clifford, M.N., 2006. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant based dietary components. *Plant Second. Metab. Occur. Struct. Role Hum. Diet* 208–302.
- Cruz, R.M., Vieira, M.C., Silva, C.L., 2006. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). *J. Food Eng.* 72, 8–15.
- De Cleyn, R., Verzele, M., 1972. Constituents of peppers. *Chromatographia* 5, 346–350.
- FAO Statistics Division. (2015) Retrieved 1st october 2015, from <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>
- Fortea, M.I., López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Carreño, J., Núñez-Delicado, E., 2009. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chem.* 113, 1008–1014.
- Geisler, J.G., Gross, G.G., 1990. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 29, 489–492.
- Hwang, Y.P., Yun, H.J., Kim, H.G., Han, E.H., Choi, J.H., Chung, Y.C., Jeong, H.G., 2011. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC $\alpha$ /ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicol. Lett.* 203, 9–19.
- Jansz, E. R., Balachandran, S., Packiyasothy, E. V., & Ratnayake, S. (1984). EFFECT OF MATURITY ON SOME CHEMICAL-CONSTITUENTS OF SRI-LANKAN PEPPER (*PIPER-NIGRUM* L). [Article]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(1), 41-46. doi: 10.1002/jsfa.2740350108
- Jennings, W., & Shibamoto, T. (1980). *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*. London, United Kingdom: Academic Press.
- Kondjoyan, N., & Berdagué, J. L. (1996). *A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds*. Laboratoire Flaveur: INRA de Theix, France,.
- Mathai, C. K. (1981). ACCUMULATION PATTERN OF OLEORESIN AND RELATED CHEMICAL-CONSTITUENTS IN BLACK PEPPER (*PIPER-NIGRUM*) BERRIES DURING GROWTH AND DEVELOPMENT. [Article]. *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition*, 31(1), 3-10. doi: 10.1007/bf01093883
- Rathnawathie, M., & Buckle, K. A. (1984). EFFECT OF BERRY MATURATION ON SOME CHEMICAL-CONSTITUENTS OF BLACK, GREEN AND WHITE PEPPER

- (PIPER-NIGRUM L) FROM 3 CULTIVARS. [Article]. *Journal of Food Technology*, 19(3), 361-367.
- Richard, H., Multon, J.-L., others, 1992. Les arômes alimentaires. Tec & Doc-Lavoisier Paris.
- Rudra, S.G., Shivhare, U.S., Basu, S., Sarkar, B.C., 2008. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in coriander leaves. *Food Bioprocess Technol.* 1, 187–195.
- Schweiggert, U., Mix, K., Schieber, A., & Carle, R. (2005). An innovative process for the production of spices through immediate thermal treatment of the plant material. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2), 143-153. doi: 10.1016/j.ifset.2005.11.006
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., del Amor, F.M., Núñez-Delicado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. *Food Chem.* 107, 193–199. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.028
- Sumathykutti, M. A., Rao, J. M., Padmakumari, K. P., & Narayanan, C. S. (1999). Essential oil constituents of some *Piper* species. [Article]. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 279-282. doi: 10.1002/(sici)1099-1026(199909/10)14:5<279::aid-ffj821>3.0.co;2-0
- Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A., 2005. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc.
- Toivonen, P.M., Brummell, D.A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 1–14.
- Van Boekel, M.A., 2008. Kinetic modeling of reactions in foods. CRC press.
- Weil, M., Descroix, F., Sing, A. S. C., Boulanger, R., Hoarau, M., Levesque, A., & Bohuon, P. (2014). Postharvest treatments of wild pepper (*Piper* spp.) in Madagascar. *Fruits*, 69(5), 371-380. doi: 10.1051/fruits/2014025
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Ben Salem, N., Gargouri, Y., Sayari, A., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 634–641. doi:10.1016/j.lwt.2012.07.036

## Annexe 1 : Résultats des analyses sensorielles

### RESULTATS DES TESTS DE CLASSEMENT :

Le test de classement permet d'évaluer des différences entre plusieurs échantillons basées sur l'intensité d'un seul attribut, de plusieurs attributs ou de l'impression globale. Elle est utilisée pour trouver si des différences existent, mais elle ne peut pas déterminer le degré de différence qui existe entre les échantillons

Ces résultats sont analysés par un test de Friedman (ou de Page) afin de déterminer si des différences significatives existent entre les échantillons.

Le test de Friedman consiste à comparer un F théorique avec un F observé.

$$F_{obs} = \frac{F}{J \times P \times (P + 1)} \times \left( \sum T_p^2 \right) - 3 \times J \times (P + 1)$$

J = nombre de juge

P = nombre de produits à classer

Tp = somme de rangs obtenus par le produit

Niveau du test : 5%

Nombre de juge : 12

Seuil de significativité à 5% ( $\alpha= 0,05$ ) : 9.60

Mat : Maturité

#### Test gustatif sur poivre en grain :

Produit 1 : Mat C grain

Produit 2 : Mat B grain

Produit 3 : Mat A grain

Test Significatif : Non

#### Test olfactif sur poivre en grain :

Produit 1 : Mat B grain

Produit 2 : Mat C grain

Produit 3 : Mat A grain

Test Significatif : Non

#### Test gustatif sur poivre moulu :

Produit 1 : Mat C poudre

Produit 2 : Mat A poudre

Produit 3 : Mat B poudre

Test Significatif : Oui

#### Test Olfactif sur poivre moulu :

Produit 1 : Mat A poudre

Produit 2 : Mat B poudre

Produit 3 : Mat C poudre

Valeur de F : 8.17e+00

Niveau du test : 5%

Produit 1 :

Somme des rangs : 31.0

Produit 2 :

Somme des rangs : 24.0

Produit 3 :

Somme des rangs : 17.0

## RESULTATS DES TESTS TRIANGULAIRES NF ISO 4120

Le test triangulaire permet de déterminer s'il existe une différence sensorielle perceptible ou une similitude entre deux échantillons.

1. Le résultat de chaque juge suit une loi de Bernoulli. La loi binomiale intervient dans la somme de variables de Bernoulli. Avec une probabilité de succès constante d'un juge à l'autre et chaque variable Bernoulli soit indépendante :

$$p = (X_i \times 0) + (X_i \times 1)$$

$X_i$  réponse du juge  $i$

0 pour échec de réponses

1 pour réponse exacte

La distribution binomiale est caractérisée par deux paramètres :  $0 < p < 1$  et  $n$  supérieur ou égal à 0 ;  $p$  est la probabilité d'identifier l'échantillon unique sous  $H_0$  et  $n$  nombre de juges ayant participé au test.

### Test olfactif sur poivre en grain (Mat : maturité, G : Grains) :

#### Test 1 :

PRODUIT A	<b>Mat B G</b>
PRODUIT B	<b>Mat C G</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>6</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

#### Test 2 :

	<b>Mat A G</b>
PRODUIT A	
PRODUIT B	<b>Mat B G</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>3</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

#### Test 3 :

PRODUIT A	<b>Mat A G</b>
PRODUIT B	<b>Mat C G</b>
Nombre de juges	<b>12</b>

Nombre de réponses correctes	7
Test de différence (risque alpha à 5%)	NON

**Test gustatif sur poivre en grain (Mat : maturité, G : Grains) :**

**Test 1 :**

PRODUIT A	Mat A G
PRODUIT B	Mat B G
Nombre de juges	12
Nombre de réponses correctes	6
Test de différence (risque alpha à 5%)	NON

**Test 2 :**

PRODUIT A	Mat A G
PRODUIT B	Mat C G
Nombre de juges	12
Nombre de réponses correctes	9
Test de différence (risque alpha à 5%)	OUI

**Test 3 :**

PRODUIT A	Mat B G
PRODUIT B	Mat C G
Nombre de juges	12
Nombre de réponses correctes	6
Test de différence (risque alpha à 5%)	NON

**Test olfactif sur poivre moulu (Mat : maturité, M : moulu) :**

**Test 1 :**

PRODUIT A	Mat A M
PRODUIT B	Mat B M
Nombre de juges	12
Nombre de réponses correctes	4
Test de différence (risque alpha à 5%)	NON

**Test 2 :**

PRODUIT A	<b>Mat B M</b>
PRODUIT B	<b>Mat C M</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>4</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

**Test 3 :**

PRODUIT A	<b>Mat A M</b>
PRODUIT B	<b>Mat C M</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>3</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

**Test gustatif sur poivre moulu (Mat : maturité, M : moulu) :**

**Test 1 :**

PRODUIT A	<b>Mat A M</b>
PRODUIT B	<b>Mat B M</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>5</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

**Test 2 :**

PRODUIT A	<b>Mat B M</b>
PRODUIT B	<b>Mat C M</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>4</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

**Test 3 :**

PRODUIT A	<b>Mat A M</b>
PRODUIT B	<b>Mat C M</b>
Nombre de juges	<b>12</b>
Nombre de réponses correctes	<b>6</b>
Test de différence (risque alpha à 5%)	<b>NON</b>

## Annexe 2 : Protocole de détermination de l'activité enzymatique du poivre (PPO et POD)



Pôle Agroalimentaire Réunion

Activité	Nom/Fonction	Date
Rédaction	Boris Vaitilingom/Stagiaire	23/08/2016
Approbation	Mathieu Weil/Chercheur	

**Diffusion :**

Laboratoire QualiSud

**Documents liés :**

Fichier Excel des consommables, Fichier Excel des produits chimiques, Fiche de suivi du stock  
Protocole spectrophotomètre  
Protocole broyeur Retsch Grindomix GM200

Propriété de : CIRAD QualiSud

## 1. Objet et domaine d'application

La présente procédure a pour objet de décrire les différentes étapes qui permettront de déterminer l'activité des polyphénols oxydases et des peroxydases du poivre.

## 2. Documents de référence

Publication:

Korbel, E., Servent, A., Billaud, C., & Brat, P. (2013). Heat Inactivation of Polyphenol Oxidase and Peroxidase as a Function of Water Activity: A Case Study of Mango Drying. *Drying Technology*, 31(13-14), 1675-1680. doi: 10.1080/07373937.2013.808659

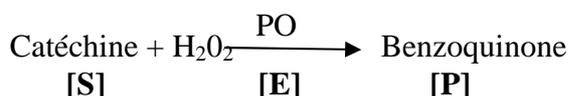
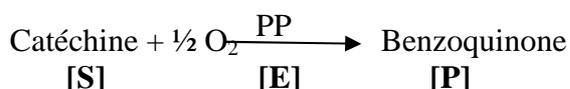
## 3. Principe

Extraction des polyphénols oxydases et des peroxydases par centrifugation.

Mesure de l'absorbance par spectrophotométrie à 420 nm.

L'absorbance révèle l'activité catalytique de l'enzyme, exprimée par la vitesse d'apparition du produit de sa catalyse qui absorbe à 420 nm.

### Réactions enzymatiques :



[S] : Substrat

[E] : Enzyme

[P] : Produit

## 4. Définitions et abréviations

PPO : Polyphénol oxydase

POD : Peroxydase

PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

## 5. Suivi des modifications

Version 1

## 6. Description des activités

### 6.1. Matériels utilisés

#### Matériel analytique :

- Broyeur Retsch GRINDOMIX GM 200
- Balance de précision à 0,0001 g près
- Centrifugeuse avec rotor SIGMA-11135
- Spectrophotomètre Helios  $\alpha$  v4.60 (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Cuves en quartz pour le spectrophotomètre
- pH-mètre

#### Matériel de laboratoire :

- Spatules
- Entonnoir
- Fioles jaugées ambrées de 50 ml (2 : 1 pour PPO, 1 pour POD)
- Flacons ambrés (2 : 1 pour PPO, 1 pour POD)
- Bêchers
- Pipette man de 5000  $\mu$ L (P5000), 200  $\mu$ L (P200) et de 10 $\mu$ L (P10)
- Connes pour pipette man

#### Consommables :

- Azote liquide
- Eppendorf de 2 ml (1 par échantillon)
- Glace fondante
- PVPP (0,1g par échantillon)
- Tampon MacLaine pH 6,5 (à conserver au froid) : réalisé en mélangeant  
50 ml Acide citrique monohydraté (0,1M) : 2.101g/100ml H<sub>2</sub>O  
100 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2M) : 2.839g/100ml H<sub>2</sub>O

Ces deux produits doivent être mélangés au fur et à mesure/avec précaution afin d'obtenir un pH de 6,5 (mesurer en continue pendant le mélange) qui est optimal pour les 2 réactions enzymatiques.

Pour 30 échantillons :

- Substrat PPO : Peser 0.157g de catéchine pour 50ml de tampon MacLaine
- Substrat pour la POD : 35 $\mu$ l Gaïacol + 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> QSP 50ml de tampon MacLaine

## 6.2.Méthode résumée

### Logigramme

<i>Etapes</i>	<i>Processus</i>	<i>Acteurs</i>	<i>Documents</i>	<i>Enregistrement</i>
6.3.1	Préparation du matériel, estimation des besoins et suivi du stock	Technicien	-Fichiers Excel des consommables, pds chimiques et stock	Cahier de correspondance
6.3.2	Préparation de l'échantillon	Technicien		Cahier de laboratoire
6.3.3/6.3.4/ 6.3.5	Extraction des enzymes/ Préparation des substrats/ Lecture au spectrophotomètre	Technicien		Cahier de laboratoire
6.3.6.	Expression des résultats	Technicien	Fichier Excel	Base de données

## 6.3. Méthode détaillée

### 6.3.1. Préparation du matériel

1. Laver la verrerie (lavage à l'eau savonneuse puis rinçage à l'eau distillée et séchage)
2. Allumer le spectrophotomètre (voir manuel d'utilisation du spectrophotomètre).  
Après 1 heure, régler la longueur d'onde à 420 nm.

### 6.3.2. Préparation de l'échantillon

1. Identifier l'échantillon (type, origine, date...)
2. Effectuer le broyage du poivre avec le broyeur à 10 000 trs/min pendant 10 secondes à l'azote liquide (voir le protocole d'utilisation du broyeur)
3. Récupérer la mouture dans un récipient puis la mettre au congélateur à -80°C

### 6.3.3. Extraction des enzymes

1. Peser environ 0,1 de PVPP dans un Eppendorf de 2 ml et tarer.
2. Peser ensuite **environ exactement** 0,2 g (noter la masse exacte pesée) de broyat de poivre. Tremper préalablement une spatule dans de l'azote liquide afin de faciliter le prélèvement.

3. Rajouter 1,6 ml de Tampon MacLaine à l'aide d'une pro-pipette
4. Centrifuger avec le rotor SIGMA-11135 20 min à 14 000 g à 4°C

Les enzymes (PPO et POD) se retrouvent alors dans le surnageant.

**Note importante : Les échantillons doivent toujours être dans un bac contenant de la glace fondante et cela tout au long de la manipulation. Le Tampon MacLaine doit rester au frais.**

#### **6.3.4. Préparation des substrats (pour 30 échantillons).**

Substrat pour la PPO :

1. Peser environ 0,157 g de catéchine dans une fiole ambrée de 50 ml
2. Compléter ensuite avec du tampon MacLaine jusqu'au trait de jauge
3. Après dissolution totale, transvaser la solution dans un flacon ambré.

Substrat pour la POD (à réaliser sous une hôte) :

1. Verser environ 30 ml de Tampon MacLaine dans une fiole ambrée de 50 ml
2. Prélever 35 µL de Gaïacol à l'aide d'une P100 et placer ces 35 µL dans la fiole ambrée
3. Prélever 10 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'aide d'une P10 et placer ces 10µL dans la fiole ambrée
4. Compléter ensuite avec du tampon MacLaine jusqu'au trait de jauge.
5. Après dissolution totale, transvaser la solution dans un flacon ambré

**Note importante : Il est nécessaire de bien agiter les solutions. Le bain à ultrasons est préconisé car la dissolution n'est pas évidente. Ces solutions doivent être préparées extemporanément ; c'est-à-dire environ 30 minutes avant utilisation.**

#### **6.3.5. Lecture au spectrophotomètre à 420 nm (voir le protocole d'utilisation du spectrophotomètre)**

**Note importante : Les substrats doivent être préalablement laissés 30 minutes à température ambiante.**

**Les extraits enzymatiques doivent rester dans la glace.**

1. Utiliser des cuves en quartz
2. Utiliser du Tampon MacLaine pour effectuer le zéro du spectrophotomètre
3. Prélever 100 µL d'extrait enzymatique et les placer dans la cuve à l'aide d'une P200
4. Prélever 1400 µL de substrat et les placer dans la cuve à l'aide d'une P5000. Relever les absorbances toutes les 5 secondes pendant 1 minute.

**Note importante : La relève des absorbances doit commencer dès la mise en contact enzyme-substrat**

### 6.3.6. Expressions des Résultats

1. Saisir les résultats sur Excel (Figure 1)

PPO	Temps (sec)	D.O
	5,000	0,492
	10,000	0,502
	15,000	0,531
	20,000	0,557
	25,000	0,61
	30,000	0,664
	40,000	0,776
	50,000	0,896
	60,000	1,013

Figure 9 : Saisie des données sur Excel

2. Tracer la D.O en fonction du temps
3. Ajouter une courbe de tendance linéaire
4. Afficher l'équation de la droite ainsi que le coefficient de détermination (Figure 2)

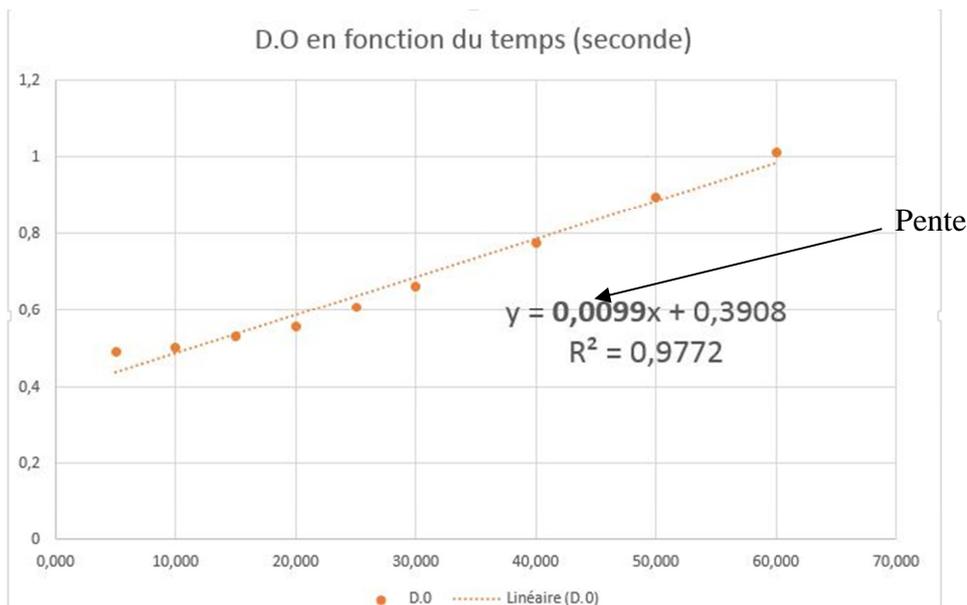


Figure 10 : D.O en fonction du temps

La pente de la courbe déterminera l'activité de l'enzyme en % d'augmentation de DO/minute

5. Diviser ensuite cette valeur par la quantité de poivre pesée (6.3.3, étape 2) pour exprimer l'activité enzymatique en % d'augmentation de DO/minute/matière fraîche.

Ce résultat peut être exprimé en base sèche si la matière sèche a été déterminé par ailleurs.

**Note importante :** Pour une comparaison entre les cinétiques, les extractions et les lectures au spectrophotomètre doivent être réalisées sans délais.

### Annexe 3 : Réduction de l'activité enzymatique (PPO et POD)

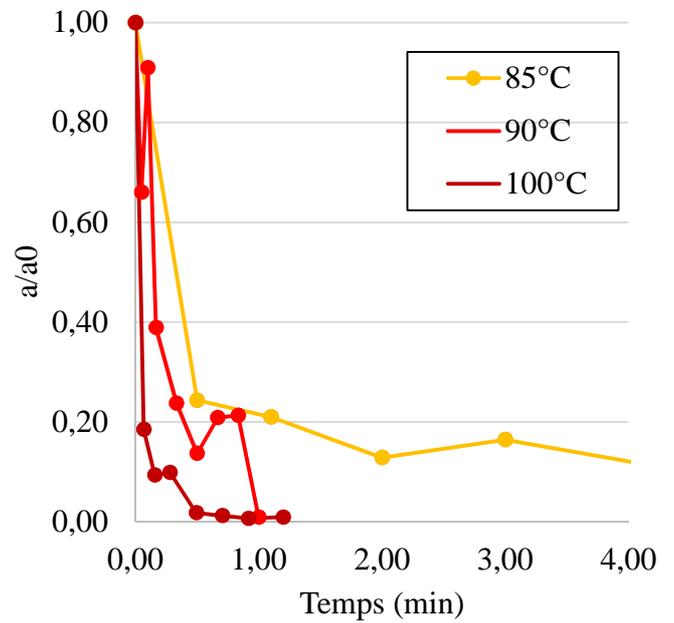
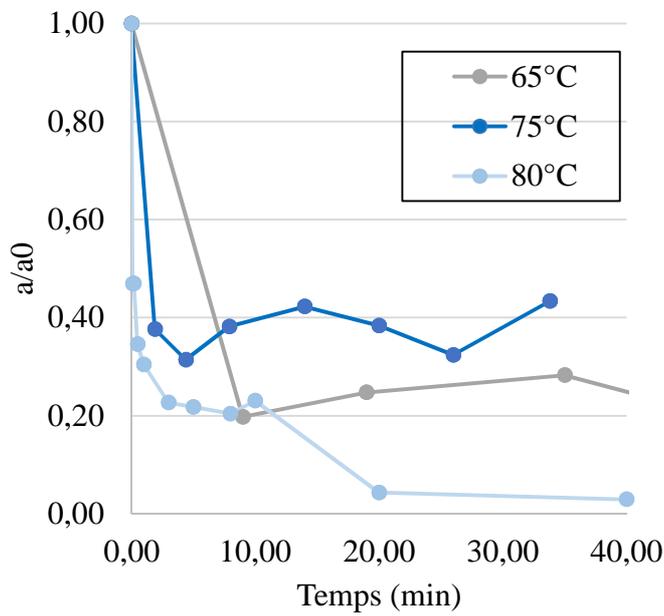


Figure 11 : Réduction de l'activité enzymatique( PPO) en fonction du temps (min)à 65, 75, 80, 85, 90 et 100°C

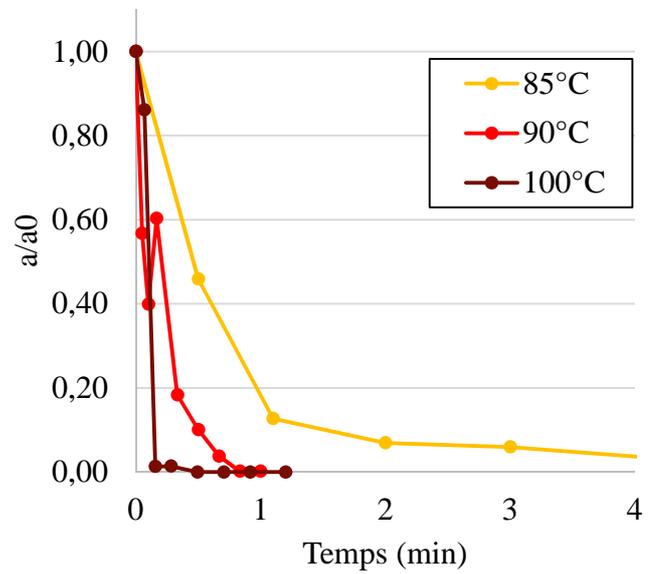
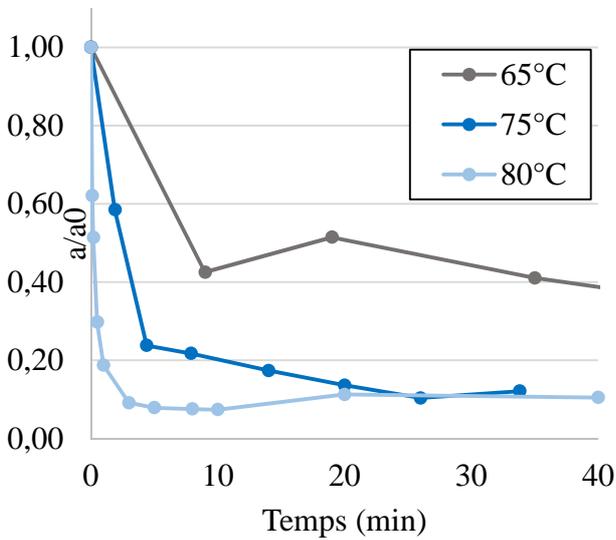


Figure 12 : Réduction de l'activité enzymatique( POD) en fonction du temps (min)à 65, 75, 80, 85, 90 et 100°C

## Annexe 4 : Représentation logarithmique de la réduction de l'activité enzymatique (PPO)

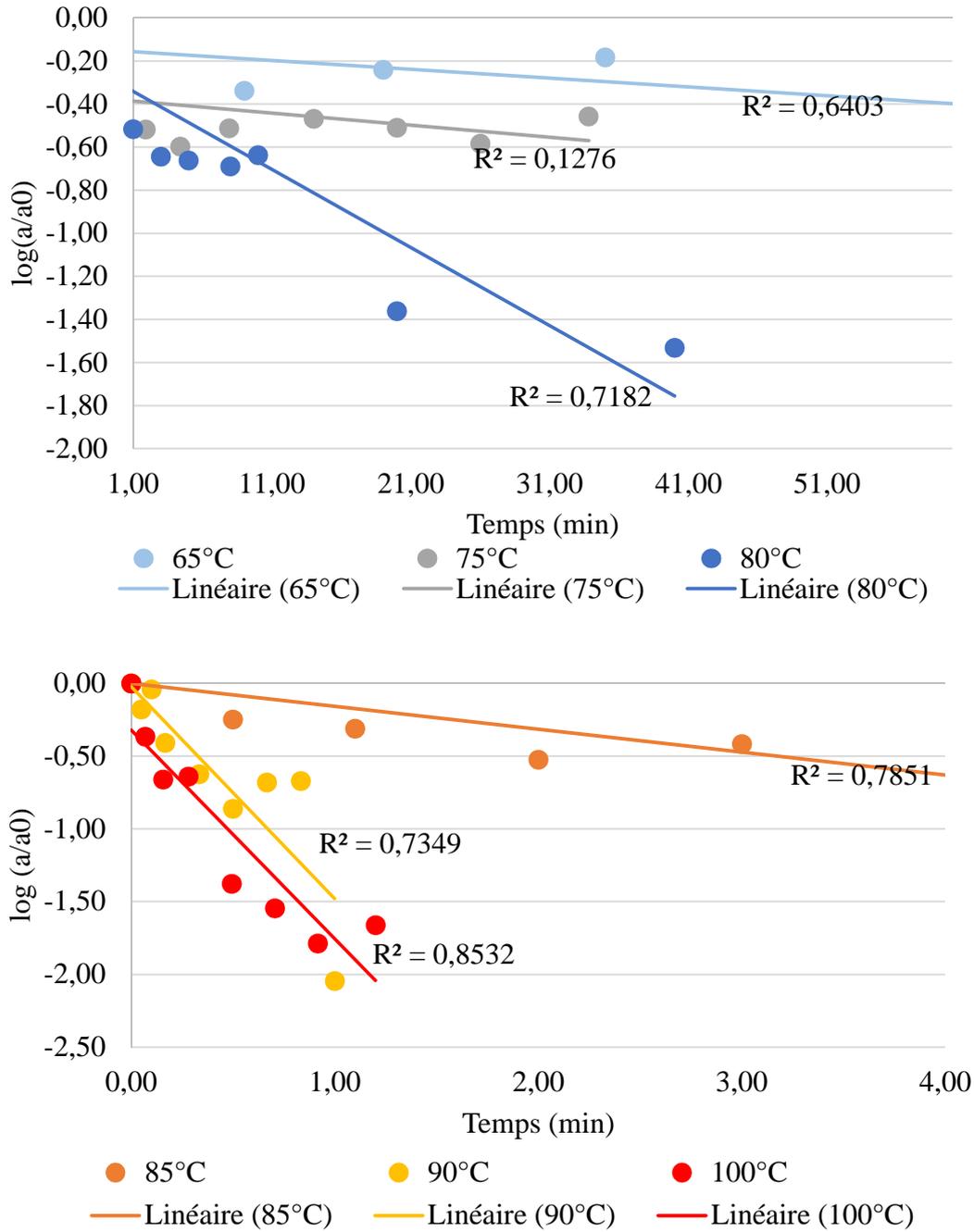


Figure 13 : Représentation logarithmique de la réduction de l'activité enzymatique (PPO), en fonction du temps à 65,75,80,85,95 et 100°C