



Fate of folates during vegetables processing : identification of key points and mechanisms

Nicolas Delchier

► **To cite this version:**

Nicolas Delchier. Fate of folates during vegetables processing : identification of key points and mechanisms. Food and Nutrition. Université d'Avignon, 2012. French. <NNT : 2012AVIG0640>. <tel-00858359>

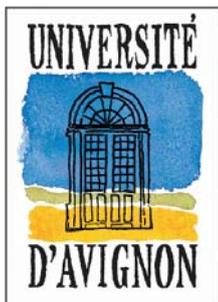
HAL Id: tel-00858359

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00858359>

Submitted on 5 Sep 2013

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

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



UNIVERSITÉ D'AVIGNON
ET DES PAYS DE VAUCLUSE

ACADEMIE D'AIX MARSEILLE
Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
ED 536 Sciences et Agrosociences

THESE

présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

Spécialité : Biochimie

Devenir des folates au cours de la transformation des végétaux verts : identification des points clés et des mécanismes.

par Nicolas Delchier

Soutenue le 21 Décembre 2012, devant le jury composé de :

Mme Marie-Noëlle Maillard	Professeure des Universités AgroParisTech	Rapporteur
Mr Eric Marchioni	Professeur des Universités Université de Strasbourg	Rapporteur
Mr Michael Rychlik	Professeur des Universités Technische Universität München	Examineur
Mr Christophe Nguyen-Thé	Directeur de Recherche INRA Avignon	Examineur
Mme Catherine Renard	Directrice de Recherche INRA Avignon	Directrice de thèse

UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale
INRA – Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
Equipe « Qualité et Procédés »



Remerciements

Je remercie Mr Christophe Nguyen-Thé et Mme Catherine Renard, successivement directeur de l'UMR 408 « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale » de m'avoir accueilli au sein de l'unité afin de réaliser ma thèse.

Ce travail de thèse a été mené sous la direction scientifique de Mme Catherine Renard, ses conseils, sa patience, ses connaissances et son implication ont contribué pour une grande part à sa réalisation. Je tiens à lui adresser tous mes remerciements et toute ma gratitude.

Je remercie Mme Marie-Noëlle Maillard, Professeure des Universités à AgroParisTech, et Mr Eric Marchioni, Professeur des Universités à l'Université de Strasbourg, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Mr Christophe Nguyen-Thé, Directeur de Recherche à l'INRA, et Mr Michael Rychlik, Professeur des Universités à la Technische Universität de Munich, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineur.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leur conseil et le suivi attentif qu'ils ont portés sur l'évolution de mon travail. Merci à Mme Dalal Aoudé Werner, Chef de projet à l'Aérial de Strasbourg, Mr Francis Courtois, Professeur des Universités à AgroParisTech et Mr Michael Rychlik.

Je remercie l'ANR pour le financement de ma thèse et les partenaires du projet Ribenut pour les conseils qu'ils m'ont apportés tout au long de ces trois années.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements et ma reconnaissance à Mr Michael Rychlik qui m'a accueilli au sein de son laboratoire à deux reprises. Merci d'avoir tout mis en place afin que mes deux séjours se soient déroulés le mieux possible. Je remercie également Christiane, Martina, Nina, Barbara, pour leur aide dans le laboratoire, pour leur sympathie, leur bonne humeur et les quelques progrès en Allemand qu'elles ont pu m'apporter... ! Merci aussi à l'ensemble du personnel du « Zentralinstitut für Ernährungs und lebensmittelforschung » pour leur gentillesse.

Je remercie Mme Dalal Aoude Werner et Mlle Julie le Grandois pour leur accueil et l'aide qu'elles m'ont apportées lors de la mise en place du dosage des folates.

Je remercie Mme Catherine Bonazzi, Mme Marie-Elisabeth Cuvelier et Mr Francis Courtois, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de l'UMR 1145 Génial d'AgroParisTech. Merci pour votre aide, votre attention, vos conseils. Merci à tous les membres de l'équipe et aux doctorants de l'UMR pour leur gentillesse.

Merci à Mme Rachel Galland pour son aide lors du prélèvement des échantillons à l'usine.

Mon travail de thèse n'aurait pas eu la même saveur sans l'ensemble de la formidable équipe « fruit » Carine, Sylvie, Barbara, Sylvaine, Marielle, Caroline, Line, Jean-François, Patrice, Christian. Merci de m'avoir aidé, soutenu et supporté (dans les deux sens...!) pendant ces trois années. Je garderai un souvenir fort de mon passage au sein de l'équipe.

Merci à Sylvaine, Sylvie, Barb' et Line d'avoir relu pour « les fote d'ortographe » !

Merci à tonton Dav'... « C'est comme une envie de on pense qu'on n'y arrivera jamais puis finalement on y arrive... ! » Voilà j'y suis... !

Spéciale dédicace à Maryse qui coule des jours paisibles à la retraite ! Merci de m'avoir aidé à mon arrivée, merci pour ta cocotte minute, ton livre de recette, et tes explications culinaires précises qui ont fait, sans nul doute, la qualité de cette étude !!

Merci à l'équipe de la microbio et de la chimie, pour votre gentillesse à mon égard.

Merci aux doctorants et stagiaires de l'UMR pour leur sympathie et les bons moments passés ensemble. Bravo à ceux qui ont déjà fini et bon courage pour les autres ! Merci à Benoit et Clémence, collègues de projet. Merci à Raïssa et Laura, avec qui j'ai travaillé durant ma thèse, pour leur travail sérieux et leur sympathie.

Un grand merci aux copains rencontrés pendant ma thèse ou ceux de plus longue date. Merci à Aurélie, Thomas, Juju, Estelle, Steph, Romain, Benoit, Antoine. J'espère qu'on aura encore de bons moments à passer ensemble. Les copains de longue date ! Alizée, PJ, Pierrot, Marion, Yo, Zaza (Alex et p'tit Adrien compris !) Clément, Karine (p'tit Arno aussi !) sans oublier tous les copains de la « DT » Corrézienne ! Vous m'avez toujours encouragé et soutenu, merci simplement d'avoir été là.

Mes parents, Amélie et Christophe, vous avez toujours été là pour moi... ! Trouvez dans ce modeste travail l'immense gratitude que je vous dois.

La meilleure, Aude. Tu m'as, aidé, encouragé, réconforté et surtout supporté ..., tu as tout fait pour moi pendant ces derniers mois qui n'ont pas dû être des plus faciles pour toi, alors même

que tu vies la même chose. Je n'ai pas assez de mots pour te remercier... Dans quelques mois je prendrai la relève... j'essaierai de faire aussi bien !

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.	Les folates	5
1.1	Propriétés physico-chimiques des folates	5
1.1.1	Composition	5
1.1.2	Spectres UV-visible et fluorescence	8
1.1.3	Ionisation	10
1.2	Biosynthèse des folates	11
1.2.1	Synthèse de l'acide para-aminobenzoïque	12
1.2.2	Synthèse du cycle ptérine	13
1.2.3	Association de l'acide para-aminobenzoïque et du précurseur ptéridinique....	14
1.2.4	Elongation de la queue polyglutamate	16
1.2.5	Synthèse des différents dérivés à partir du tétrahydrofolate	17
1.2.5.1	Synthèse du tétrahydrofolate (H ₄ folate)	18
1.2.5.2	Synthèse de l'acide 10-formyltétrahydrofolique (10-HCO-H ₄ folate).....	19
1.2.5.3	Synthèse de l'acide 5-formyltétrahydrofolique (5-HCO-H ₄ folate).....	19
1.2.5.4	Synthèse de l'acide 5,10-méthényltétrahydrofolique (5,10-CH ⁺ -H ₄ folate)	20
1.2.5.5	Synthèse de l'acide 5,10-méthylènetétrahydrofolique (5,10-CH ₂ -H ₄ folate).....	22
1.2.5.6	Synthèse de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique (5-CH ₃ -H ₄ folate)	23
1.2.6	Conclusions	23
1.3	Fonctions biologiques	24
1.3.1	Synthèse du panthoténate et du thymidilate	24
1.3.2	Synthèse de la méthionine et du S-adénylméthionine	24
1.3.3	Synthèse des nucléotides et du formylméthionyl-ARNt.....	25
1.4	Compartimentation et trafic intracellulaire	25
1.5	Biodisponibilité	26
1.5.1	Absorption des folates	26
1.5.2	Biodisponibilité	27
1.6	Effets santé	29
1.6.1	Anomalies de fermeture du tube neural	29
1.6.2	Maladies cardiovasculaires	30
1.6.3	Cancer colorectaux	30
1.6.4	Pouvoir antioxydant	31
1.7	Sources alimentaires et apports recommandés.....	31
1.7.1	Sources alimentaires.....	31
1.7.2	Apports recommandés.....	34
2.	Les épinards.....	34
2.1	Aspects botaniques	34
2.2	Culture et production industrielle.....	35

2.3	Valeur nutritionnelle	36
3.	Les haricots verts.....	38
3.1	Aspects botaniques.....	38
3.2	Culture et production industrielle.....	40
3.3	Valeur nutritionnelle	42
4.	Les procédés de transformation dans les industries agroalimentaires.....	43
4.1	La congélation	43
4.1.1	La nucléation	43
4.1.2	Etapes de la congélation.....	44
4.1.3	Cas particulier de la congélation des tissus végétaux	45
4.1.4	Procédés de congélation	46
4.1.4.1	Congélateurs à production de froid mécanique	47
4.1.4.2	Congélation cryogénique.....	48
4.2	La stérilisation	48
4.2.1	Autoclaves discontinus.....	49
4.2.2	Autoclaves continus	50
4.3	Le blanchiment	52
4.3.1	Objectifs du blanchiment	52
4.3.2	Différents types de blancheur.....	53
4.3.2.1	Blancheur à eau	53
4.3.2.2	Blancheur à la vapeur	54
5.	Impact des conditions physico-chimiques, des procédés industriels ou domestiques, sur les folates.....	54
5.1	Impact des conditions physico-chimiques sur la dégradation des folates en solution modèle54	
5.1.1	Impact de l'oxygène sur la dégradation des folates	54
5.1.2	Effet des antioxydants sur la stabilité des folates.....	58
5.1.3	Effet du pH sur la dégradation des folates	62
5.1.4	Impact des traitements combinés pression-température sur la stabilité des folates	66
5.1.5	Principales conclusions	67
5.2	Impact des procédés de transformation sur les matrices végétales	68
5.2.1	Principaux résultats	68
5.2.2	Principales conclusions	75

Chapitre 2 : Objectifs et démarches

1.	Impact des transformations.....	76
2.	Etude des mécanismes	78

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

1.	Produits chimiques	79
1.1	Tampons et réactifs	79
1.2	Standards	80
1.3	Kits enzymatiques utilisés pour le dosage des sucres et acides	80

1.3.1	Dosage des sucres.....	80
1.3.2	Dosage des acides.....	81
2.	Matériel Végétal.....	82
2.1	Prélèvement du matériel végétal sur les chaînes industrielles.	82
2.1.1	Chaîne de surgélation des épinards.	82
	Les caractéristiques des lots A, B et C sont présentées dans le tableau 15.....	86
2.1.2	Chaîne d'appertisation des haricots verts.....	86
2.2	Cuissons domestiques.	93
2.2.1	Cuissons des épinards et des haricots verts frais.....	93
2.2.1.1	Cuissons dans l'eau à ébullition	93
2.2.1.2	Cuissons au cuit vapeur	93
2.2.2	Cuisson des épinards et des haricots verts surgelés	94
2.2.3	Epinards et haricots verts en conserves.....	94
3.	Cinétiques de dégradation thermique.....	95
3.1	Dégradation thermique en présence d'oxygène atmosphérique (21%).....	95
3.2	Dégradation thermique en présence de 40 % d'oxygène et en anoxie.....	96
3.2.1	Dispositif expérimental.	96
3.2.2	Dégradation thermique de l'acide folique et de l'acide 5-CH ₃ -H ₄ folate	99
3.2.2.1	Solutions mères	99
3.2.2.2	Réalisation des cinétiques	99
3.2.3	Dégradation thermique des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts	101
3.2.3.1	Préparation des purées.....	101
3.2.3.2	Réalisation des cinétiques	101
4.	Diffusion des folates à partir d'épinards et des haricots verts déstructurés	102
4.1.1	Dispositif expérimental	102
4.1.2	Préparation du matériel végétal.....	103
4.1.3	Cinétique de diffusion	104
5.	Méthodes analytiques.....	106
5.1	Dosage des folates totaux par HPLC et détection en fluorimétrie après dérivatisation.....	106
5.1.1	Principe de la méthode	106
5.1.2	Extraction et déconjugaison	107
5.1.3	Dérivatisation des dérivés de folates en acide 5-méthyltétrahydrofolique	107
5.1.4	Purification du 5-CH ₃ -H ₄ folate mono et diglutamate par chromatographie d'affinité	108
5.1.4.1	Préparation des colonnes de chromatographie	108
5.1.4.2	Purification des échantillons	108
5.1.5	Détermination de la concentration des folates totaux par HPLC.....	109
5.1.5.1	Analyse HPLC.....	109
5.1.5.2	Quantification.....	110
5.1.6	Détermination des folates totaux dans les liquides de cuisson et de recouvrement.....	110
5.2	Dosage des différents dérivés par Dilution d'Isotopes Stables	110
5.2.1	Principe de la méthode	110
5.2.2	Extraction, dilution isotopique et déconjugaison	112
5.2.3	Purification des différents dérivés.....	113
5.2.4	Détermination de la concentration des différents dérivés	113
5.2.4.1	Analyse HPLC.....	113
5.2.4.2	Conditions de spectrométrie de masse	115

5.2.4.3	Calcul de la concentration des dérivés	115
5.3	Dosage de l'acide folique par HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes	117
5.4	Dosage des caroténoïdes	118
5.4.1	Principe de la méthode	118
5.4.2	Extraction des caroténoïdes.....	118
5.4.3	Analyse HPLC.....	119
5.4.4	Quantification de la lutéine	120
5.5	Dosage de la vitamine C totale par microplaque.....	120
5.5.1	Principe de la méthode	120
5.5.2	Extraction de la vitamine C.....	120
5.5.3	Le réactif de coloration	120
5.5.4	Dosage de la vitamine C totale.....	121
5.5.5	Dosage de l'acide ascorbique.....	121
5.5.6	Calcul des concentrations.....	121
5.6	Dosage des sucres et acides.....	122
5.6.1	Dosage des sucres.....	122
5.6.1.1	Principe de la méthode	122
5.6.1.2	Extraction des sucres	124
5.6.1.3	Dosage par spectrophotométrie	125
5.6.2	Dosage des acides.....	127
5.6.2.1	Principe de la méthode	127
5.6.2.2	Extraction des acides	128
5.6.2.3	Dosage de l'acide citrique.	129
5.6.2.4	Dosage de l'acide malique	130
5.7	Détermination de la matière sèche (MS).....	130
6.	Analyse statistique.....	130
6.1	Impact des procédés industriels sur les teneurs en folates	130
6.2	Impact des cuissons domestiques sur les teneurs en folates, acide ascorbique et lutéine	131

Chapitre 4 : Impact des procédés de transformation industriels et domestiques

1.	Impact des procédés de transformation : industriels et domestiques	132
1.1	Evolution de la matière sèche au cours des procédés de transformation	133
1.1.1	Procédés industriels.....	133
1.1.1.1	Surgélation des épinards.....	133
1.1.1.2	Appertisation des haricots verts	133
1.1.1.3	Cuisson domestique des épinards.....	134
1.1.1.4	Cuisson domestique des haricots verts	134
1.2	Variabilité des matières premières	135
1.2.1	Epinards.....	135
1.2.2	Haricots verts.....	137
1.2.3	Evolution de la teneur en folates au cours du procédé de surgélation des épinards	138
1.2.4	Impact du procédé de transformation sur la teneur des différents dérivés.....	140
1.2.4.1	Impact du procédé de transformation sur les dérivés majoritaires	140
1.2.4.2	Impact du procédé de transformation sur les dérivés minoritaires.....	141
1.2.5	Impact des traitements domestiques.....	143
1.2.5.1	Teneur en folates	143

1.2.5.2	Vitamine C et lutéine.....	144
1.3	Impact de l'appertisation sur la teneur en folates dans les haricots verts.....	145
1.3.1	Impact du procédé industriel sur les folates totaux	146
1.3.2	Impact de l'appertisation sur les différents dérivés de folate.....	151
1.3.2.1	5-CH ₃ -H ₄ folate	151
1.3.2.2	Dérivés formylés	152
1.3.2.3	Dérivés minoritaires	152
1.3.3	Impact des traitements domestiques.....	154
1.3.3.1	Folates totaux	154
1.3.3.2	Vitamine C et la lutéine.....	155
2.	Discussion	157
2.1	Difficultés de l'étude de l'impact du procédé de transformation industriel.....	157
2.2	Variabilité de la matière première.....	157
2.3	Impact des procédés de transformation sur les concentrations en folates totaux...	158
2.4	Traitements hydro-thermiques	159
2.4.1	Cuisson vapeur	159
2.4.2	Blanchiment et cuisson dans de l'eau à ébullition	160
2.4.3	L'appertisation	162
2.5	Le lavage	164
2.6	La surgélation.....	164
2.7	Impact des procédés industriels sur les dérivés de folates	164
2.8	Conclusions	165

Chapitre 5 : Diffusion des folates à partir de légumes cuits

1.	Diffusion des molécules hydrophiles à partir de légumes cuits.....	167
1.1	Démarche de la modélisation	167
1.2	Diffusion des molécules hydrosolubles à partir des épinards	169
1.2.1	Diffusion des folates.....	169
1.2.1.1	Données brutes	169
1.2.1.2	Modélisation.....	171
1.2.1.3	Constantes de diffusivité et quantités résiduelles des folates à partir des épinards	172
1.2.1.4	Diffusion des dérivés de folates	173
1.2.2	Diffusion des surs et acides	175
1.3	Diffusion des molécules hydrosolubles à partir des haricots verts	176
1.3.1	Diffusion des folates.....	176
1.3.1.1	Données brutes	176
1.3.1.2	Modélisation.....	177
1.3.1.3	Constantes de diffusivité et quantités résiduelles des folates à partir des haricots verts	179
1.3.1.4	Diffusion des dérivés de folates	180
1.3.2	Diffusion des surs	181
2.	Discussion	184
2.1	Impact du pH sur la diffusion des molécules hydrosolubles.....	185
2.2	Impact de la température sur la diffusion des molécules hydrosolubles.....	186
2.3	Evolution des proportions des vitamères au cours de la diffusion.....	187
2.4	Conclusion.....	187

Chapitre 6 : Dégradation thermique des folates en solution modèle et dans les purées : le réacteur instrumenté

1. Dégradation des folates en présence d'oxygène à 21 %	188
1.1 Epinards.....	188
1.2 Haricots verts.....	192
1.3 Conclusion.....	193
2. Dégradation des folates en absence d'oxygène.....	194
3. Dégradation des folates en présence de 40 % d'oxygène	195
3.1 Epinards.....	195
3.2 Haricots verts.....	197
4. Comparaison des cinétiques de dégradation thermique	198
4.1 Epinards.....	198
4.2 Haricots verts.....	200
5. Conclusions	201
6. Evolution des différents vitamères au cours des cinétiques de dégradation en présence de 40 % d'oxygène.....	202
6.1 Epinards.....	202
6.1.1 5-CH ₃ -H ₄ folate	203
6.1.2 5-HCO-H ₄ folate	204
6.1.3 10-HCO-PteGlu.....	205
6.1.4 Dérivés minoritaires	206
6.2 Haricots verts.....	207
6.2.1 5-CH ₃ -H ₄ folate	208
6.2.2 5-HCO-H ₄ folate	209
6.2.3 10-HCO-H ₄ PteGlu	210
6.2.4 Dérivés minoritaires	211
6.3 Conclusions	212
7. Cinétique de dégradation thermique de l'acide folique et du 5-CH ₃ -H ₄ folate en solution modèle	213
7.1 Cinétique en absence d'oxygène	213
7.1.1 Acide folique	213
7.1.2 5-CH ₃ -H ₄ folate	214
7.2 En présence de 40 % d'oxygène	215
7.2.1 Acide folique	215
7.2.2 5-CH ₃ -H ₄ folate	216
7.3 Conclusions	218
8. Discussion	219
8.1 Dégradation des folates en solutions modèles.....	219
8.2 Dégradation thermique des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts.....	220
8.3 Impact de la dégradation thermique sur les cinétiques de diffusion	221
8.4 Impact de la dégradation thermique dans le procédé industriel	221

Conclusions et Perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique partagée par les différents dérivés de folates	5
Figure 2 : Biosynthèse des folates dans les plantes (adapté de Bekaert <i>et al.</i> , 2008)	12
Figure 3 : Synthèse de l'acide <i>para</i> -aminobenzoïque dans le chloroplaste	13
Figure 4 : Synthèse du cycle ptérine dans le cytosol.....	14
Figure 5 : Assemblage des deux précurseurs dans la mitochondrie : synthèse du H ₄ folate. ...	16
Figure 6 : Interconversion enzymatique des différents vitamères de folate.....	17
Figure 7 : Synthèse du H ₄ folate.....	18
Figure 8 : Synthèse du 10-HCO-H ₄ folate	19
Figure 9 : Synthèse du 5-HCO-H ₄ folate	20
Figure 10 : Synthèse du 5,10-CH ⁺ -H ₄ folate.....	21
Figure 11 : Synthèse du 5,10-CH ₂ -H ₄ folate	22
Figure 12 : Synthèse du 5-CH ₃ -H ₄ folate	23
Figure 13 : Absorption des folates dans la partie proximale du jéjunum (d'après Zhao <i>et al.</i> , 2009).....	27
Figure 14 : Plant d'épinards (source : http://amaplasemence.eklablog.com)	34
Figure 15 : Plant de haricot vert nain (Photo : D. Page)	39
Figure 16 : Courbe de congélation d'un aliment (d'après Bazinet & Castaigne, 2011).	44
Figure 17 : Congélation d'une tranche de produit (d'après Bazinet & Castaigne, 2011).	45
Figure 18 : Courbe de stérilisation (d'après Bazinet, 2011).	49
Figure 19 : Schéma d'un stérilisateur hydrostatique (d'après Bazinet & Castaigne, 2011). ...	51
Figure 20 : Stabilité des différents dérivés en fonction du pH avec ou sans incubation à 37°C d'après De Brouwer <i>et al.</i> , 2007	66
Figure 21: Représentation de la ligne de surgélation des épinards.	83
Figure 22 : Chaîne industrielle d'appertisation des haricots verts	87
Figure 23: Le réacteur instrumenté et ses différents modules.....	96
Figure 24: Le réacteur instrumenté, sondes à absorbance, fluorescence, système de prélèvement et diluteur de gaz	97
Figure 25: Instrumentation de mesure de l'oxygène.....	99
Figure 26: Dispositif expérimental pour l'étude de la diffusion des folates	103
Figure 27: Principe du dosage des folates totaux.....	106
Figure 28: Principe de la dilution isotopique (d'après Rychlik, 2008)	111
Figure 28B: Chromatogramme obtenu lors de l'analyse des dérivés de folates en LC-MS...114	
Figure 29 : Formation du complexe Fe ²⁺ 2,2dipiridyl lors du dosage de la vitamine C	120

Figure 30 : Réaction de réduction du NADP^+ au cours du dosage du glucose.	122
Figure 31 : Réaction de réduction du NADP^+ au cours du dosage du fructose.....	123
Figure 32 : Réaction de réduction du NADP^+ au cours du dosage du saccharose	124
Figure 33 : Réaction d'oxydation du NADH lors du dosage de l'acide citrique	127
Figure 34 : Réaction d'oxydation du NADH lors du dosage de l'acide malique.....	128
Figure 35 : Variabilité de la matière première d'épinards.	136
Figure 36 : Variabilité des folates dans la matière première de haricots verts.....	137
Figure 37 : Variabilité des haricots verts frais au cours des traitements domestiques.....	138
Figure 38 : Evolution de la teneur en folate dans les épinards au cours du procédé de transformation	139
Figure 39 : Evolution de la concentration des dérivés de folates au cours du procédé.....	141
Figure 40 : Evolution de la concentration des dérivés de folates minoritaires au cours du procédé de transformation	142
Figure 41 : Concentration en folates dans les épinards (crus et cuits) et dans les liquides de cuisson.....	144
Figure 42 : Concentration en lutéine et vitamine C dans les épinards crus et après cuisson .	144
Figure 43 : Evolution de la concentration en folates dans les haricots verts au cours du procédé de transformation	147
Figure 44 : Impact du mode de blanchiment (aspersion ou immersion) sur la teneur en folate	148
Figure 45 : Impact de la nature des haricots verts sur la concentration en folates au cours du procédé	149
Figure 46 : Impact de la taille de la boîte sur la concentration en folates	150
Figure 47 : Impact du procédé de transformation des haricots verts sur la concentration en $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{folate}$	151
Figure 48 : Impact du procédé de transformation des haricots verts sur la concentration des dérivés formylés	152
Figure 49 : Impact du procédé de transformation des haricots verts sur les dérivés de folate minoritaires.....	153
Figure 50 : Concentration en folates dans les haricots verts (crus et cuits) et dans les liquides de cuisson	155
Figure 51 : Concentration en lutéine et vitamine C dans les haricots verts crus et après cuisson	156
Figure 52 : Concentrations en folates (équivalent $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{folate monoglutamate}$) au cours du temps dans les épinards des cinétiques de diffusion à pH 7 et 5 et aux trois températures étudiées.....	170
Figure 53 : Modélisation de la cinétique de diffusion des folates à partir des épinards du lot 2 à pH 7 et à $45\text{ }^\circ\text{C}$	172

Figure 54 : Concentrations en folate (équivalent 5-CH ₃ -H ₄ folate monoglutamate) au cours du temps dans les haricots verts des cinétiques de diffusion à pH 7 et 5 et aux trois températures étudiées.....	177
Figure 55 : Modélisation de la cinétique de diffusion des folates à partir des haricots verts du lot 1 à pH 7 et à 65 °C.....	178
Figure 56 : Evolution des folates totaux dans les purées d'épinards	189
Figure 57 : Linéarisation des cinétiques de dégradation des folates dans les épinards selon une cinétique d'ordre 1	190
Figure 58 : Linéarisation des cinétiques de dégradation des folates dans les épinards selon une cinétique d'ordre 2	191
Figure 59 : Dégradation des folates totaux dans les purées de haricots verts	192
Figure 60 : Evolution de la concentration en folates totaux en présence de 40 % d'oxygène	195
Figure 61 : Evolution du rapport C/C ₀ en fonction de la température, à 40 % d'oxygène	196
Figure 62 : Evolution de la concentration en folates totaux en présence de 40 % d'oxygène	197
Figure 63 : Evolution des rapports C/C ₀ de folates à 21 % et 40 % d'oxygène pour les épinards	199
Figure 64 : Evolution des rapports C/C ₀ de folates à 21 % et 40 % d'oxygène pour les haricots verts	200
Figure 65 : Evolution du 5-CH ₃ -H ₄ folate en présence de 40 % d'oxygène.....	203
Figure 66 : Modélisation de la dégradation du 5-CH ₃ -H ₄ folate en présence de 40 % d'oxygène	204
Figure 67 : Evolution du 5-HCO-H ₄ folate dans les purées d'épinards en présence de 40 % d'oxygène	205
Figure 68 : Evolution du 10-HCO-PteGlu dans les épinards en présence de 40 % d'oxygène	206
Figure 69 : Evolution du 5-CH ₃ -H ₄ folate dans les haricots verts en présence de 40 % d'oxygène	208
Figure 70 : Modélisation de la dégradation du 5-CH ₃ -H ₄ folate dans les haricots verts.....	209
Figure 71 : Evolution du 5-HCO-H ₄ folate dans les haricots verts en présence de 40 % d'oxygène	210
Figure 72 : Chromatogrammes du 5-CH ₃ -H ₄ folate de cinq points de cinétique.....	217

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structures, noms et abréviations des différents dérivés de folates	7
Tableau 2 : Maxima d'absorbance des différents dérivés de folates (d'après Blakley, 1969) : longueur d'onde et coefficients d'extinction molaire	8-9
Tableau 3 : Propriétés de fluorescence des dérivés de folates (d'après Blakley, 1969)	9
Tableau 4 : Teneurs en folates présentes dans différents aliments	33
Tableau 5 : Production d'épinards pour l'industrie de la transformation	36
Tableau 6 : Valeur nutritionnelle des épinards (d'après Souci Fachmann et Kraut, 2000)	37
Tableau 7 : Concentration en folates totaux et en certains dérivés dans les épinards (mg.kg ⁻¹ de MF)	38
Tableau 8 : Production de haricots verts pour l'industrie de la transformation	41
Tableau 9 : Valeur nutritionnelle des haricots verts (source Souci, Fackmann & Kraut, 2000)	42
Tableau 10 : Concentrations en folates et en certains dérivés dans les haricots verts	43
Tableau 11 : Effet de l'oxygène sur la dégradation du 5-CH ₃ -H ₄ folate.....	57
Tableau 12 : Paramètres cinétiques de dégradation des folates : effet des antioxydants	60-61
Tableau 13 : Effet du pH sur la stabilité des dérivés de folates	64-65
Tableau 14 : Impact de différents modes de cuisson sur la perte en folates dans les légumes	72-74
Tableau 15: Caractéristiques des trois lots d'épinards prélevés sur la chaîne de surgélation ..	85
Tableau 16 : Codification des échantillons d'épinards prélevés sur la ligne de surgélation....	86
Tableau 17 : Caractéristiques des échantillons de haricots verts prélevés sur la chaîne d'appertisation.....	90
Tableau 18 : Codification des échantillons de haricots verts prélevés sur la ligne d'appertisation.....	92
Tableau 19 : Codification des prélèvements des cinétiques de dégradation thermique des folates en solution modèle.....	100
Tableau 20 : Codification des échantillons des cinétiques de dégradation thermique des folates dans les purées d'épinards.....	102
Tableau 21 : Codification des échantillons des cinétiques de dégradation thermique des folates dans les purées de haricots verts.	102
Tableau 22 : Codification des échantillons des cinétiques de diffusion des folates à partir d'haricots verts et d'épinards cuits.....	105
Tableau 23: Gradient d'élution utilisé pour le 5-CH ₃ -H ₄ folate mono et diglutamate.....	109
Tableau 24: Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des dérivés de folates.....	114
Tableau 25 : Conditions de spectrométrie de masse pour l'analyse des dérivés de folates. ..	115
Tableau 26: Longueurs d'onde et coefficients d'extinction molaire utilisés pour le calcul des concentrations des différents dérivés	116

Tableau 27 : Gradient d'éluion utilisé pour l'analyse des dérivés de folates.....	117
Tableau 28 : Gradient d'éluion utilisé pour l'analyse de l'acide folique.....	118
Tableau 29: Gradient d'éluion utilisé pour l'éluion des caroténoïdes.	119
Tableau 30 : Dilutions appliquées au surnageant extrait pour le dosage des sucres dans les liquides de diffusion.....	125
Tableau 31: Dilutions appliquées au surnageant des extraits pour le dosage de l'acide malique.....	129
Tableau 32 : Evolution de la matière sèche des épinards au cours du procédé de transformation pour les trois lots prélevés	133
Tableau 33 : Evolution de la matière sèche au cours du procédé de transformation des haricots verts pour les 5 lots prélevés	134
Tableau 34 : Evolution de la matière sèche dans les épinards au cours des traitements domestiques.....	134
Tableau 35 : Evolution de la matière sèche dans les haricots verts au cours des traitements domestiques.....	135
Tableau 36 : Constantes de diffusivité et quantités résiduelles en folates dans les épinards. 173	
Tableau 37 : Concentrations des dérivés de folates à t_0 et t_∞ (mg.kg^{-1}) dans les épinards.....	174
Tableau 38 : Constantes de diffusivité et quantités résiduelles en glucose et acide malique dans les épinards.....	175
Tableau 39 : Constantes de diffusivité et quantité résiduelle des folates à partir des haricots verts.....	179
Tableau 40 : Concentrations des dérivés de folates à t_0 et t_∞ (mg.kg^{-1}) dans les haricots verts.....	180
Tableau 41 : Constantes de diffusivité et quantités résiduelles des sucres et acides des haricots verts.....	182
Tableau 42 : Conditions et résultats des incubations de purées de légumes en absence d'oxygène.....	194
Tableau 43 : Evolution des dérivés minoritaires dans les épinards au cours des cinétiques en presence de 40 % d'oxygène.....	207
Tableau 44 : Evolution du 10-HCO-H ₄ folate à 45 et 65 °C dans les haricots verts à 40 % d'oxygène.....	211
Tableau 45 : Evolution des vitamères (C/C_0) minoritaires dans les haricots verts à 40 % d'oxygène.....	212
Tableau 46 : Evolution de l'acide folique à pH 5 et 7, en anoxie.....	214
Tableau 47 : Evolution du C/C_0 du 5-CH ₃ -H ₄ folate à pH 5 et 7, en anoxie.....	214
Tableau 48 : Evolution de l'acide folique (C/C_0) à pH 5 et 7 en présence de 40 % d'oxygène.....	215
Tableau 49 : Dégradation du 5-CH ₃ -H ₄ folate à pH 5 en présence de 40 % d'oxygène.....	216
Tableau 50 : Dégradation du 5-CH ₃ -H ₄ folate à pH 7 en présence de 40 % d'oxygène.....	216

Liste des abréviations

λ_{max} : Longueur d'onde d'absorbance maximale

ϵ : Coefficient d'extinction molaire

ADP: Adénosine DiPhosphate

ACP: Acyl Carrier Protein

ANSES: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ATP: Adénosine TriPhosphate

CTCPA : Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles

DO: Densité Optique

dUMP: Désoxyuridine monophosphate

dTMP : Désoxythymidine monophosphate

EPI: Epinard

GCII: Glutamylcarboxypeptidase II

GTP: Guanosine TriPhosphate

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HV: Haricot vert

LC-FD: Liquid Chromatography-Fluorimetry Detection

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

MA: Dosage microbiologique

MF: Matière Fraîche

MRP: Multidrug Resistance Protein

MS: Matière Sèche

NAD (/H): Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADP (/H): Nicotinamide Adénine Dinucléotide

PCFT: Proton Coupled Folate Transporter

Rf: Facteur de réponse

RFC: Reduced Folate Carrier

SIDA: Stable Isotope Dilution Assay

Introduction

Le travail de thèse que j'ai réalisé sur le devenir des folates au cours de la transformation des végétaux verts, par l'identification des points clés et des mécanismes, s'inscrit dans le projet ANR Ribenut 2010 – 2014: « Nouvelles approches pour une évaluation du compromis risque microbiologique - bénéfice nutritionnel pour les légumes traités thermiquement ».

La préservation de la qualité nutritionnelle et microbiologique lors de la transformation des produits alimentaires est une exigence clé pour les industries agroalimentaires. Dans le cas particulier des traitements thermiques, la préservation de la qualité nutritionnelle implique souvent une réduction ou une limitation de l'intensité du traitement. Dans un même temps, les traitements thermiques ont généralement un impact positif sur la sécurité microbiologique des produits transformés en inactivant les microorganismes pathogènes. Les industries alimentaires ont donc la nécessité de trouver le meilleur compromis entre la qualité nutritionnelle et la sécurité microbiologique des produits. L'objectif du projet Ribenut est de fournir les connaissances scientifiques nécessaires afin de développer un modèle mathématique et un outil informatique d'aide à la décision afin de déterminer ce meilleur compromis.

Un des facteurs de l'impact positif des fruits et légumes dans la nutrition humaine est leur forte teneur en vitamine. Ils sont en particulier une source majeure de vitamine C (acide ascorbique et déhydroascorbate), pour lesquels ils représentent plus de 70 % des apports journaliers en France d'après l'étude INCA 2 (Lafay, 2009). Pour les folates, la proportion est plus faible mais toujours importante, aux alentours de 40 %. Une proportion significative de la population Française ne couvre pas ses apports journaliers en vitamine, ceci étant d'autant plus marqué pour les folates, notamment chez les femmes enceintes ou en âge de procréer. Parmi les légumes, les épinards et les haricots verts ont des teneurs en folates très fortes et sont pour la plupart consommés sous forme de produits transformés (80 % pour les épinards et 82 % pour les haricots verts). Une augmentation de la teneur en folates dans les fruits et légumes transformés obtenue par une préservation optimisée serait donc d'un grand intérêt à la fois pour le consommateur dans un but de bénéfice nutritionnel, et pour les industries alimentaires comme un attribut de la qualité de leurs produits.

En 2006, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments avait recommandé de conduire une approche quantitative ou semi-quantitative pour l'analyse de la balance entre les risques et les bénéfices. Cependant, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments reconnaît qu'une telle approche de modélisation est rarement menée du fait d'un manque de connaissances de base

sur le risque et le bénéfique ou bien le manque d'outils d'intégration des données issues des deux aspects qui ne sont pas disponibles.

Le projet Ribenut, propose de traiter la préservation des vitamines en particulier des folates, dans le cas des bénéfices nutritionnels, *versus* la réduction des bactéries et spores pathogènes, dans le cas du risque microbiologique. Néanmoins, cette approche générique pourra être transférée par la suite à l'étude d'autres compromis tels que les économies d'énergies, dans le cas des bénéfices économiques et environnementaux, versus la réduction des bactéries et spores pathogènes, dans le cas du risque microbiologique.

Dans ce cadre, j'ai donc étudié spécifiquement le devenir des folates au cours de la transformation des végétaux, qu'elle soit industrielle ou domestique, ainsi que les mécanismes physico-chimiques régissant ces pertes.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'étude bibliographique. Il est divisé en trois parties. La première est consacrée au folates, de leur structure chimique à leur bénéfique santé. La seconde présente les procédés industriels que nous avons étudiés, à savoir la surgélation, le blanchiment et la stérilisation. Enfin, la dernière partie est consacrée à la synthèse des études antérieures sur l'impact des procédés industriels et domestiques sur les folates, qu'ils soient en solution modèle ou dans des matrices végétales.

Le deuxième chapitre du manuscrit détaille les objectifs de mon travail de thèse et la démarche que j'ai mis en œuvre afin de répondre aux questions de recherche posées. Il lui succède le chapitre Matériel et Méthodes.

Enfin, sont présentés dans trois chapitres les résultats obtenus. Le premier expose les résultats du bilan des pertes en folates au cours des procédés de transformation industriels et domestiques. Pour ce faire, deux procédés industriels, la surgélation des épinards et l'appertisation des haricots verts, et deux modes de cuissons domestiques, dans de l'eau à ébullition et à la vapeur, ont été étudiés. Les concentrations en folates ont été déterminées pour chacune des étapes unitaires présentant un risque de perte important. Nous nous sommes donc focalisés sur les étapes faisant intervenir des traitements thermiques comme le blanchiment, la stérilisation et la surgélation, mais aussi les étapes faisant intervenir un contact direct avec de l'eau tel que le lavage.

Au cours de cette étude, les folates ont été dosés par deux méthodes différentes, la première permettant un dosage total des folates par HPLC avec une détection en fluorimétrie, l'autre

permettant un dosage des différents dérivés par dilution d'isotopes stables et une détection en spectrométrie de masse. La méthode de dosage des folates totaux a été développée au sein du laboratoire grâce à la collaboration avec le centre technique Aérial (Strasbourg), mise en place dans le cadre du projet Ribenuit. Afin de préciser les résultats et d'étudier le comportement des différents dérivés au cours de la transformation, leur dosage a été réalisé par la méthode développée par l'équipe du Pr. Rychlik (TU München). Ce travail a été réalisé au cours d'un séjour de deux mois au sein de son laboratoire. Le financement de ce séjour a été possible grâce au prix spécial du jury de l'Institut Appert que j'ai obtenu en 2010.

Le bilan des pertes en folates au cours des procédés de transformation industriels et domestiques a permis d'identifier les mécanismes impliqués dans ces pertes. Le deuxième temps de l'étude a donc été l'analyse des mécanismes physico-chimiques régissant les pertes en folates, à l'échelle du laboratoire. Notre étude s'est centrée sur deux mécanismes, la diffusion des folates à partir de légumes cuits et la dégradation thermique des folates, en solution modèle et à partir de matrices végétales.

Lors de l'étude de la dégradation thermique des folates (en solution modèle et dans des purées), les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température et les teneurs en oxygène ont été contrôlés de manière très précise. Pour cela, des cinétiques ont été réalisées à l'aide d'un réacteur instrumenté, développé par l'équipe Calipro de l'UMR 1145 Génial d'AgroParisTech, au cours d'un séjour d'un mois et demi au sein de cette UMR.

La conclusion de ce manuscrit fera le point sur les résultats marquants de mon travail de thèse et les perspectives de recherche possibles seront présentées.

Mon travail a fait l'objet de deux communications sous forme d'articles scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture. Le premier article publié présente les résultats de l'étude des pertes en folates au cours des traitements domestiques avec comme nouvelle approche la détermination de la teneur en folates à la fois dans les légumes et les liquides de cuissons. Cet article a été publié dans la revue *LWT-Food Science and Technology* :

- Nicolas Delchier, Maryse Reich, & Catherine M.G.C. Renard. (2012). Impact of cooking methods on folates, ascorbic acid and lutein in green beans (*Phaseolus vulgaris*) and spinach (*Spinacea oleracea*). *LWT - Food Science and Technology*, 49, 197.

Le deuxième article (en cours de révision), présente les résultats de l'impact des procédés industriels sur les teneurs en folate avec comme nouvelle approche un bilan global de deux chaînes de transformations industrielles mettant à jour les étapes où les pertes en folate sont les plus marquées. Cet article a été soumis à la revue *Food Chemistry* :

- Nicolas Delchier, Christiane Ringling, Julie Le Grandois, Dalal Aoudé-Werner, Rachel Galland, Stéphane Georgé, Michael Rychlik & Catherine M.G.C. Renard. Effects of industrial processing on folate content in green vegetables. *Food Chemistry*. (Soumis).

Enfin, un troisième article est en préparation sur les mécanismes physico-chimiques et leur modélisation, régissant les pertes en folate au cours des procédés industriels.

J'ai présenté trois communications, une sous forme de conférence orale au congrès international *EuroFoodChem* à Gdansk en Pologne :

- Nicolas Delchier, Catherine M.G.C. Renard, Impact of industrial processing on folate contents in green vegetables. *EuroFoodChem XVI*, 6-8 Juillet 2011, Gdansk, Pologne.

Et deux autres sous forme de poster, le premier au congrès international *Fruit and Vegetable Processing* à Avignon et le second au congrès international *EFFoST* à Montpellier :

- Nicolas Delchier, Maryse Reich & Catherine M.G.C. Renard, What happens to folates when green beans and spinach are cooked in home conditions?. *Euro-Mediterranean Symposium for Fruit & Vegetable Processing*, 18-21 April 2011, Avignon, France.
- Nicolas Delchier, Jean-François Maingonnat & Catherine M.G.C. Renard, Leaching appears to be the main mechanism of folate loss during processing. *EFFoST European Federation of Food Science and Technology*, 20-23 Novembre 2012, Montpellier, France.

Chapitre 1 :
Synthèse bibliographique

1. Les folates

Les folates, molécules isolées dans les années 1930, sont des vitamines hydrosolubles du groupe B. Leur principal rôle, dans le métabolisme végétal et animal, est d'être des donneurs de groupements monocarbonés.

1.1 Propriétés physico-chimiques des folates

1.1.1 Composition

Le terme folate(s) désigne un ensemble de molécules qui partagent toutes la même structure de base, celle de l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique). Il s'agit d'une structure (Figure 1) composée de trois parties. Le cycle ptérine est lié à un acide *para*-aminobenzoïque par une liaison C₉-N₁₀. L'acide *para*-aminobenzoïque est lié à une chaîne de résidus glutamate par une liaison peptidique entre le groupement carboxyle de l'acide *para*-aminobenzoïque et le groupement amine du premier résidu glutamate. Les résidus glutamate sont liés entre eux par des liaisons γ -peptidiques (Scott *et al.*, 2000).

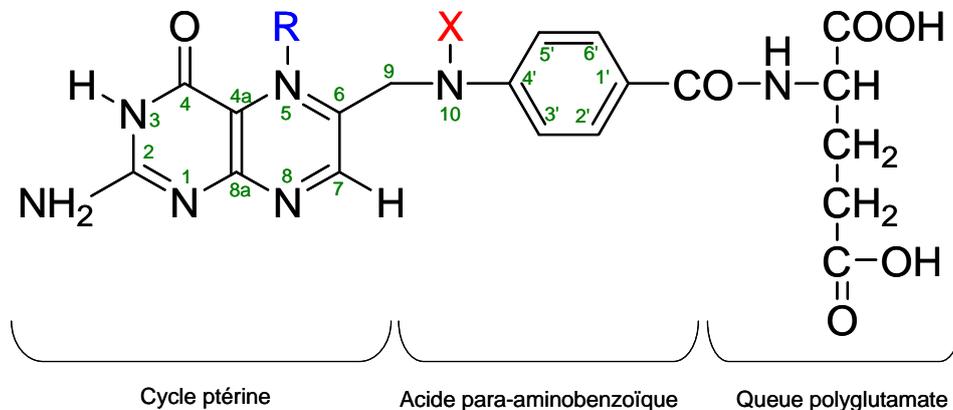


Figure 1 : Structure chimique partagée par les différents dérivés de folates

R et X indiquent les sites de substitution possibles en fonction de la nature du dérivé, les différentes substitutions sont présentées dans le Tableau 1.

Les dérivés de folates se différencient par :

- Le degré d'oxydation de la molécule, les folates pouvant être soit totalement oxydés, soit partiellement réduits en acide 7,8-dihydrofolique, ou encore totalement réduits en acide 5,6,7,8-tétrahydrofolique.

- La nature du groupement carboné greffé sur l'atome d'azote 5 ou sur l'atome d'azote 10. Les folates peuvent être substitués par un groupement méthyle ou formyle.
- Enfin, par la longueur de la chaîne glutamate qui varie, dans les milieux biologiques, de 2 à 14 résidus.

Ces différents degrés d'oxydation de la molécule et la nature de la substitution conduisent à la formation de différentes molécules dont les structures, les noms ainsi que les abréviations IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sont présentés dans le Tableau 1.

Un aspect important dans la structure des folates est la chiralité portée par le carbone 6 pour certains des dérivés de folate. *In vivo*, l'activité de la vitamine est seulement portée par les isomères (6*S*).

Tableau 1 : Structures, noms et abréviations des différents dérivés de folates

Structures	Substitutions	Noms	Abréviations
	R = H	Acide folique	PteGlu
	R = CHO	Acide 10, formyle-folique	10-HCO-PteGlu
	R = H	Acide 5,6-dihydrofolique	H ₂ folate
	R = CH ₃	Acide 5-méthyle-5,6-dihydrofolique	5-CH ₃ -H ₂ folate
	R = H X = H	Acide 5,6,7,8-tétrahydrofolique	H ₄ folate
	R = CH ₃ X = H	Acide 5-méthyle-tétrahydrofolique	5-CH ₃ -H ₄ folate
	R = CHO X = H	Acide 5-formyle-tétrahydrofolique	5-HCO-H ₄ folate
	R = H X = CHO	Acide 10-formyle-tétrahydrofolique	10-HCO-H ₄ folate
		Acide pteroïque	-
		Acide 5,10-méthényle-tétrahydrofolique	5,10-CH ⁺ -H ₄ folate
		Acide 5,10-méthylène-tétrahydrofolique	5,10-CH ₂ -H ₄ folate

1.1.2 Spectres UV-visible et fluorescence

Les folates présentent des spectres d'absorbance caractéristiques dans l'ultra-violet, avec en général trois maxima d'absorbance bien que certains dérivés ne possèdent que deux, voire un maxima (Tableau 2). Un maximum d'absorbance est porté par l'acide *para*-aminobenzoïque qui possède un pic d'absorbance à 273 nm. L'acide *para*-aminobenzoïque participe donc au maximum d'absorbance des différents dérivés dans la région de 270 à 280 nm. Les autres maxima d'absorbance des dérivés de folates sont portés par le cycle ptérine. La variabilité des coefficients d'absorbance donnés dans le Tableau 2 peut s'expliquer par le degré de pureté des molécules utilisées, la dégradation des dérivés en solution au cours des expériences et la présence d'eau liée aux différents dérivés qui peuvent fausser la valeur des données, ces caractéristiques étant très peu précisées par les auteurs comme le mentionne Blakley (Blakley, 1969).

Tableau 2 : Maxima d'absorbance des différents dérivés de folates (d'après Blakley, 1969) : longueur d'onde et coefficients d'extinction molaire

Dérivé	pH	λ_{max} (nm)			ϵ ($\times 10^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)		
PteGlu	1		296			20,4	
	1	247	296		12,8	19,7	
	7		282	346		27,6	7,2
	11	255	282	365	26,5	26,3	9,4
	13	256	283	365	24,5	23,4	8,5
	13	256	283	365	26,9	25,9	9,4
10-HCO-PteGlu	13	256	284	366	24,6	24,5	8,6
	1	252		321	21,8		7,6
	7	245	269	348	20,0	20,9	5,7
	13	257		366	31,6		6,8
H ₂ folate	13	256		366	31,8		6,8
	1		282			19,9	
	1		283			15,4	
	7	224	282		32,7	28,4	
	7	225	282		24,1	22,4	
	7,5		283			19,0	
	11		284			22,6	
	13		284			27,0	
H ₄ folate	13		288			18,2	
	13		285			20,4	
	0		267	292		15,4	20,6
	1		271	292		21,4	19,1
	3	215	270	290	40,8	25,4	22,8
	7	220	297		31,4	29,1	
	7		297		22		

Tableau 2 (suite) : Maxima d'absorbance des différents dérivés de folates (d'après Blakley, 1969) : longueur d'onde et coefficients d'extinction molaire

Dérivé	pH	λ_{\max} (nm)		ϵ ($\times 10^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	
H ₄ folate	7	298		25	
	7	298		28	
	7,2	298		28,4	
	7,5	298		22	
	13	298		25,7	
	13	290		21,6	
5,10-CH ₂ -H ₄ folate	7,2	294		32	
	7,5	295		25	
5-HCO-H ₄ folate	7	258		15,3	
	13	253			
5,10-CH ⁺ -H ₄ folate	0	290	348		26,5
	0	288	345	13,5	26
	2	283	352	11,8	25,0
	3		360		25,1
5-CH ₃ -H ₄ folate	7	290		23,7	
	7	290		35,4	

λ_{\max} : longueur d'onde d'absorbance maximale ; ϵ : coefficient d'extinction molaire

Par ailleurs, le H₂folate et tous les dérivés H₄folate, excepté le 5,10-CH⁺-H₄folate, montrent un maximum d'excitation entre 300 et 320 nm et un maximum d'émission de fluorescence entre 360 et 425 nm, comme présenté dans le Tableau 3. Le pH de la solution a un effet très marqué sur la fluorescence. Ainsi, la fluorescence du H₄folate augmente dans des conditions de pH acide. De plus, de nombreux tampons exercent un effet d'inhibition de fluorescence (Blakley, 1969).

Tableau 3 : Propriétés de fluorescence des dérivés de folates (d'après Blakley, 1969)

Dérivés	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité de fluorescence	pH optimum	Gamme pH testée	Concentration (μM)
H ₄ folate	305-310	360	1600	3	2-10	3,8
5-HCO-H ₄ folate	314	365	32	7	7-9	50
10-HCO-H ₄ folate	313	360	47	7	7-9	7
5,10-CH ⁺ -H ₄ folate	370	470	500	4	3-6	8,8
H ₂ folate	317	425	32	9	5-9	11
PteGlu	363	450-460	1	9	2-9	50
10-HCO-PteGlu	364	450-460	140	9	2-9	50

1.1.3 Ionisation

Les folates, en fonction de leur substitution, comportent de nombreuses fonctions chimiques ionisables telles que des groupements carboxyles notamment au niveau de la queue polyglutamate et des groupements amines du cycle ptérine.

A pH physiologique, la charge globale des folates est négative. Cette charge négative est due à l'ionisation complète des deux groupements carboxyles (Zhao *et al.*, 2009).

Les constantes de dissociation du H₄folate ont été déterminées par titrimétrie et spectrophotométrie dans des gammes de pH de 3 à 14. Six groupes dissociables ont été identifiés : le groupe amide en position 3-4, avec une constante de dissociation pK' de 10,5 ; l'azote 5 dont le pK' est de 4,82 ; le groupement carboxyle du glutamate en position γ dont le pK' est d'environ 4,8 ; le groupement carboxyle du glutamate en position α dont le pK' est d'environ 3,5 ; l'azote 1 avec un pK' de 1,24 et l'azote 10 dont le pK' est de 1,25 (Blakley, 1969).

L'acide folique présente un pKa d'environ 5 pour le groupement hydroxyle greffé sur le carbone 4 (Blakley, 1969).

Trois constantes d'ionisation ont été déterminées pour le 5-HCO-H₄folate, les deux premières constantes sont portées par les groupements carboxyles des résidus glutamates avec des valeurs de 3,1 et 4,8. La dernière constante est donnée par le groupement hydroxyle du carbone 4 avec un pKa de 8,2 (Blakley, 1969).

La valeur du pK du 5,10-CH⁺-H₄folate a été déterminée par spectrophotométrie comme étant de 8,95 et est attribuée au groupement amide porté par le cycle ptérine (Blakley, 1969).

Les folates, dont la charge globale est négative, sont généralement très peu solubles aux pH acides (pH compris entre 2 et 4), avec des espèces monocationiques et neutres prédominantes. La solubilité augmente avec le pH avec principalement des espèces anioniques. Enfin, la solubilité des folates est forte à des pH très faibles (entre 0 et 1). L'acide ptéroïque, qui correspond à l'acide folique dépourvu de résidu glutamate, est moins soluble que l'acide folique sur l'ensemble de la gamme de pH. Les folates polyglutamylés, du fait de leur groupement carboxylique libre associé à chaque résidu glutamate montrent un caractère anionique plus fort que les folates sous forme monoglutamate à des valeurs de pH intermédiaires et basiques (Blakley, 1969). A contrario, une chaîne polyglutamate longue entraîne un caractère hydrophobe plus important que pour les chaînes polyglutamates courtes lorsque le groupement carboxyle du résidu glutamate est protoné (ex : à pH 2).

La stabilité des différents folates est largement influencée par le pH du milieu. L'influence du pH sur la stabilité des folates est plus prononcée pour les dérivés substitués par un groupement formyle. Le 5,10-CH⁺-H₄folate est formé spontanément à partir du 5-HCO-H₄folate ou du 10-HCO-H₄folate à pH acide, avec un taux proportionnel à l'acidité du milieu. La réaction est totale à un pH inférieur à 2.

1.2 Biosynthèse des folates

Les étapes de la biosynthèse des folates (Figure 2) sont similaires chez les plantes et les bactéries (Rébeillé *et al.*, 2006). Les enzymes de la voie de biosynthèse et les gènes associés sont bien connus pour les deux groupes (Bekaert *et al.*, 2008). La synthèse des folates conduit à la formation du tétrahydrofolate mono puis polyglutamate. Deux précurseurs sont impliqués dans la biosynthèse, l'acide *para*-aminobenzoïque qui est synthétisé dans le chloroplaste de la cellule végétale et le cycle ptérine synthétisé dans le cytosol. Les deux précurseurs seront associés dans la mitochondrie. Les réactions biochimiques de synthèse de chaque précurseur ainsi que l'association de ces derniers seront développées dans les paragraphes suivants.

L'Homme ne possède pas l'ensemble des enzymes de la biosynthèse des folates, c'est pourquoi son statut en folates est lié à l'apport alimentaire.

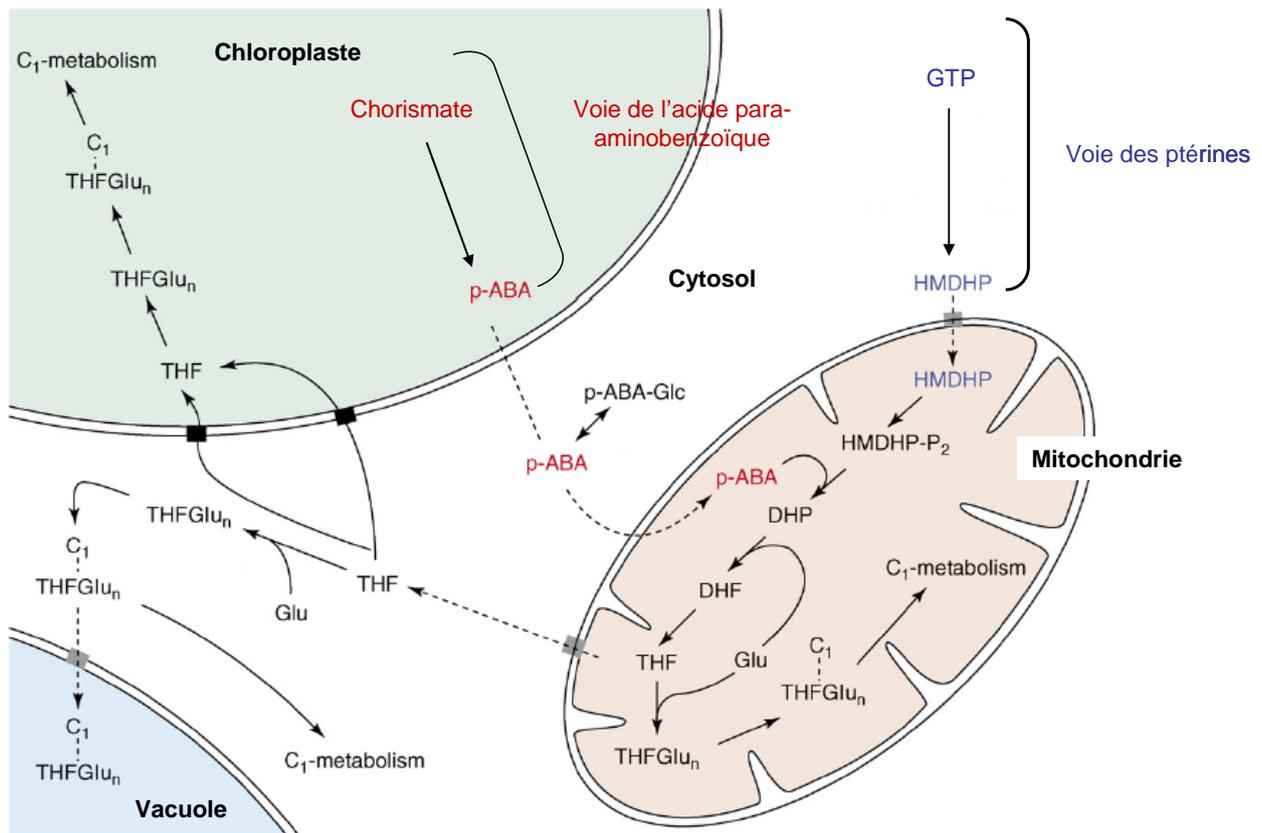


Figure 2 : Biosynthèse des folates dans les plantes (adapté de Bekaert *et al.*, 2008)

HMDHP : 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptéridine ; HMDHP-P₂ : 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptéridine diphosphate ; DHP : Dihydroptéroate ; DHF : Dihydrofolate ; THF : Tétrahydrofolate ; Glu : Glutamate ; THFGlu_n : Tétrahydrofolate lié à n résidus glutamate ; p-ABA : Acide *para*-aminobenzoïque

1.2.1 Synthèse de l'acide *para*-aminobenzoïque

La synthèse de l'acide *para*-aminobenzoïque se fait dans le chloroplaste par trois réactions biochimiques présentées dans la Figure 3. A partir du métabolisme des sucres, *via* la voie de biosynthèse de l'acide shikimique, le 5-*O*-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate est déphosphorylé et déprotoné en chorismate par la chorismate synthase (réaction 1). Le chorismate est converti en 4-amino-4-désoxychorismate, en présence de glutamine et de magnésium par l'aminodésoxychorismate synthase (réaction 2). Enfin, le 4-amino-4-désoxychorismate est converti en acide *para*-aminobenzoïque par l'aminodésoxychorismate lyase (réaction 3).

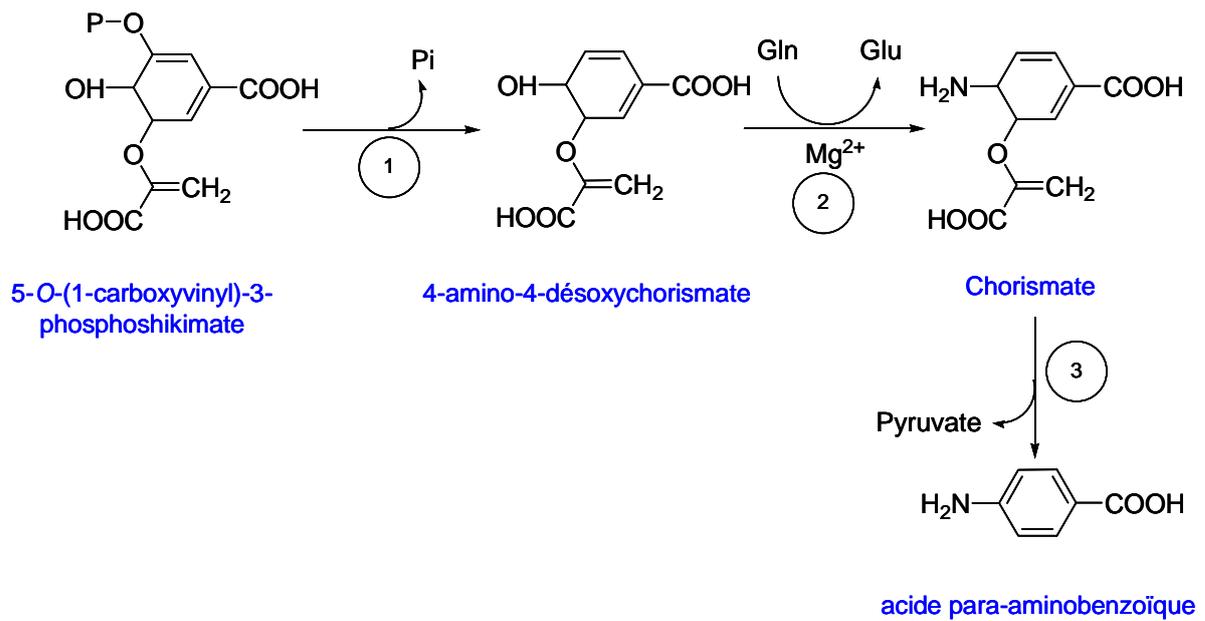


Figure 3 : Synthèse de l'acide *para*-aminobenzoïque dans le chloroplaste

1 : Chorismate synthase ; 2 : Amino-désoxychorismate synthase ; 3 : Amino-désoxychorismate lyase.

Gln : Glutamine ; Glu : Glutamate

L'acide *para*-aminobenzoïque va être exporté, vers le cytosol puis vers la mitochondrie, où il sera associé au cycle ptérine, par un mécanisme de diffusion passive au travers de la membrane chloroplastique.

La principale source d'acide *para*-aminobenzoïque utilisée lors de la synthèse des folates est l'acide *para*-aminobenzoïque sous forme d'ester glucopyranosyl cytosolique qui est converti en acide *para*-aminobenzoïque par la *p*-ABA glucosyltransférase (Quinlivan *et al.*, 2003).

1.2.2 Synthèse du cycle ptérine

La synthèse du cycle ptérine se déroule dans le cytosol à partir du GTP par quatre réactions successives (Figure 4). Le GTP est décyclisé en 7,8 dihydronéoptérine-3'-triphosphate par la GTP-cyclohydrolase (étape 1). La deuxième étape de la synthèse consiste en la déphosphorylation du 7,8-dihydronéoptérine-3'-triphosphate en 7,8-dihydronéoptérine-monophosphate par la dihydronéoptérine-triphosphate pyrophosphatase. Le 7,8 dihydronéoptérine-monophosphate est ensuite hydrolysé en 7,8-dihydronéoptérine par une phosphatase non spécifique (étape 3). Le groupement glycolaldéhyde du 7,8-dihydronéoptérine est clivé par la dihydronéoptérine aldolase pour donner le 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine (étape 4). Le 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine est

enfin transféré à la mitochondrie par un transport actif, dont le transporteur reste encore non identifié, pour être associé à l'acide *para*-aminobenzoïque.

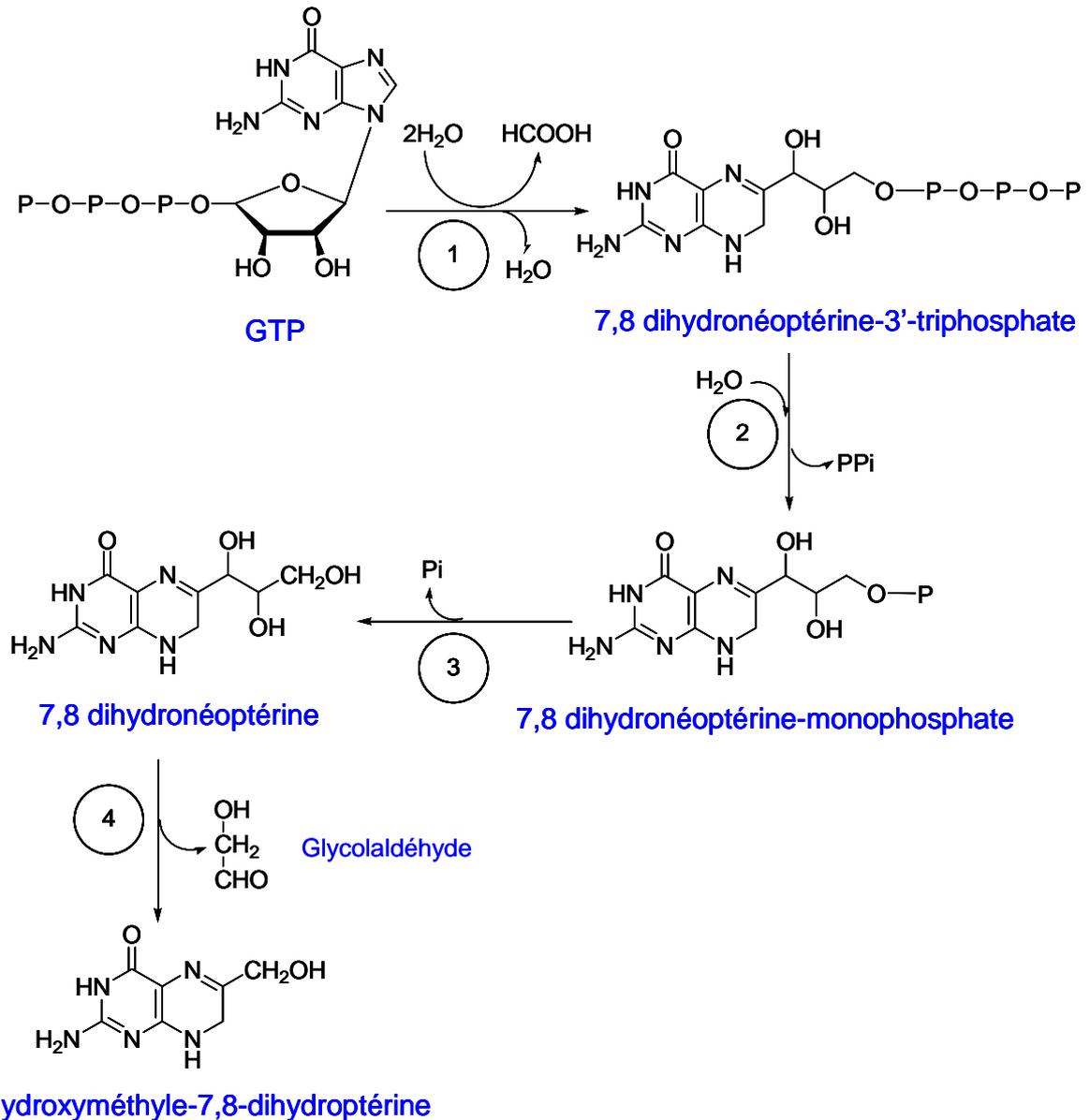


Figure 4 : Synthèse du cycle ptérique dans le cytosol

HCOOH : Acide méthanoïque ; 1 : GTP cyclohydrolase ; 2 : Dihydroptérine-triphosphate pyrophosphatase ; 3 : Phosphatase non spécifique ; 4 : Dihydroptérine aldolase.

1.2.3 Association de l'acide *para*-aminobenzoïque et du précurseur ptéridinique

L'assemblage de l'acide *para*-aminobenzoïque et du cycle ptérique se déroule dans la mitochondrie (Figure 5). La première étape est l'activation par phosphorylation du 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine en 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine diphosphate.

Cette réaction est réalisée par la 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxyméthyl-dihydroptéridine diphosphokinase ATP-dépendante. La deuxième réaction est la condensation de l'hydroxyméthyl-dihydroptérine-diphosphate avec l'acide *para*-aminobenzoïque par la dihydroptéroate synthase qui conduit à la formation du dihydroptéroate. Chez les plantes, ces deux dernières étapes sont réalisées par une enzyme bi-fonctionnelle, l'hydroxyméthyl-dihydroptérine pyrophosphokinase – dihydroptéroate synthase, alors que chez les bactéries, ces deux étapes sont catalysées par deux enzymes distinctes (Rébeillé *et al.*, 1997).

La troisième étape de la voie de synthèse mitochondriale correspond à la réaction ATP-dépendante d'attachement du premier résidu glutamate sur le groupement carboxyle de l'acide *para*-aminobenzoïque pour former le H₂folate. Cette réaction est catalysée par la dihydrofolate synthétase.

Le H₂folate est réduit en H₄folate par la dihydrofolate réductase, cette réaction nécessite l'oxydation du NADPH en NADP⁺. Dans les plantes et les protozoaires l'activité de la dihydrofolate réductase est portée par une enzyme bifonctionnelle, la dihydrofolate réductase – thymidylate synthase, dans laquelle les deux activités sont couplées par un système de canalisation (Rébeillé *et al.*, 2006).

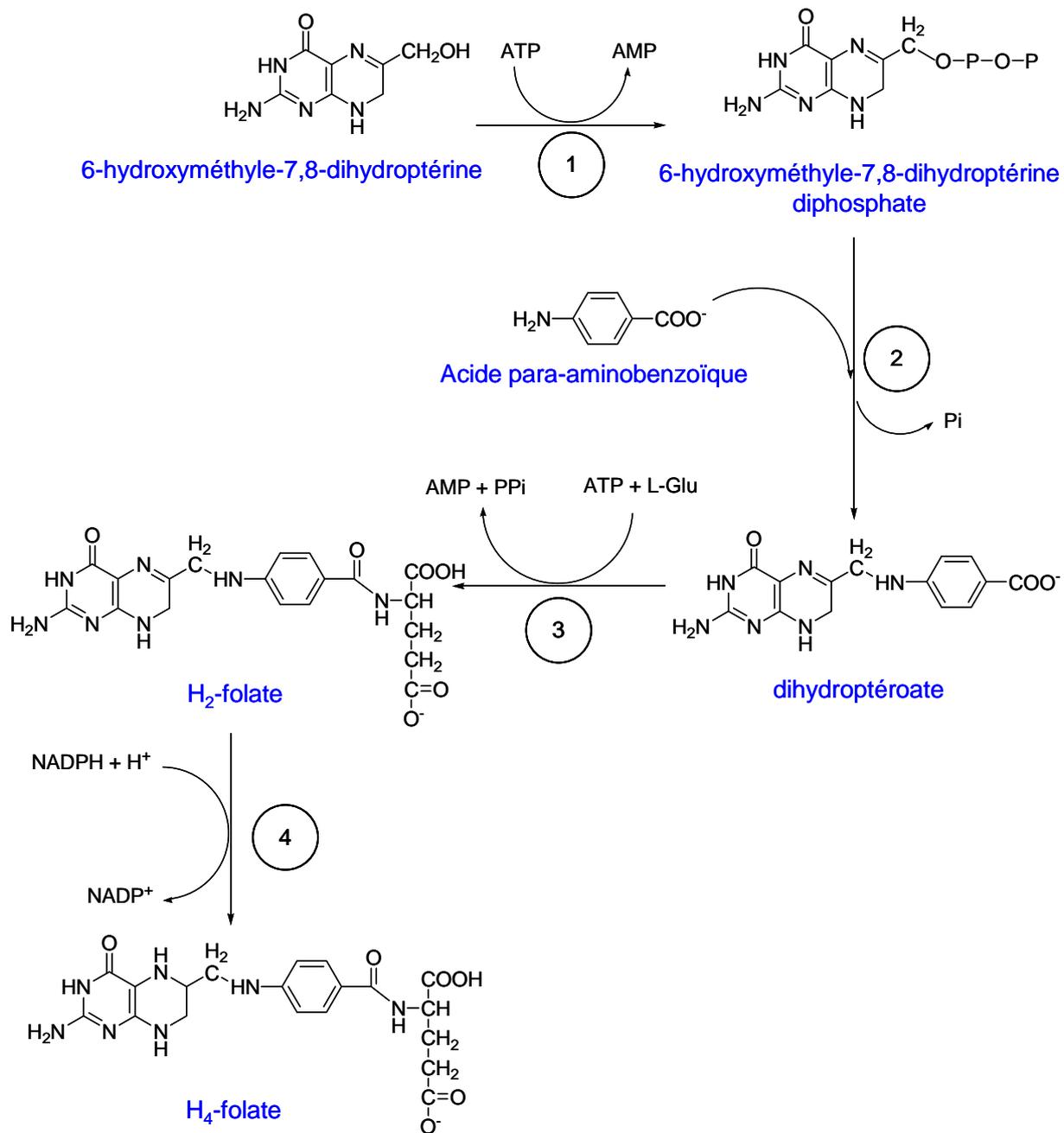


Figure 5 : Assemblage des deux précurseurs dans la mitochondrie : synthèse du H₄folate.

1 : 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxyméthylidihydroptéridine diphosphokinase ATP dépendante ;
 2 : Dihydroptéroate synthase ; 3 : Dihydrofolate synthétase ; 4 : Dihydrofolate réductase

1.2.4 Elongation de la queue polyglutamate

L'élongation de la chaîne polyglutamate du tétrahydrofolate-monoglutamate se fait par la folylpolyglutamate synthase. L'addition des résidus glutamate par l'enzyme est ATP-dépendante. Chez *Arabidopsis thaliana*, trois isoformes de l'enzyme ont été isolées, la première est localisée dans la mitochondrie, la deuxième dans le cytosol et la dernière dans les chloroplastes. Les enzymes provenant de différentes sources (eucaryotes ou procaryotes)

présentent différentes spécificités de substrat, notamment liées à la nature du groupement de substitution (formyle ou méthyle) mais aussi au nombre de résidus glutamates présents sur le H₄folate (Cossins *et al.*, 1997).

1.2.5 Synthèse des différents dérivés à partir du tétrahydrofolate

La synthèse des folates *de novo* conduit à la formation du H₄folate, les différents vitamères vont être synthétisés à partir du H₄folate par des interconversions enzymatiques, présentées dans la Figure 6. Les différentes réactions d'interconversions pour les différents dérivés sont présentées dans les paragraphes suivants.

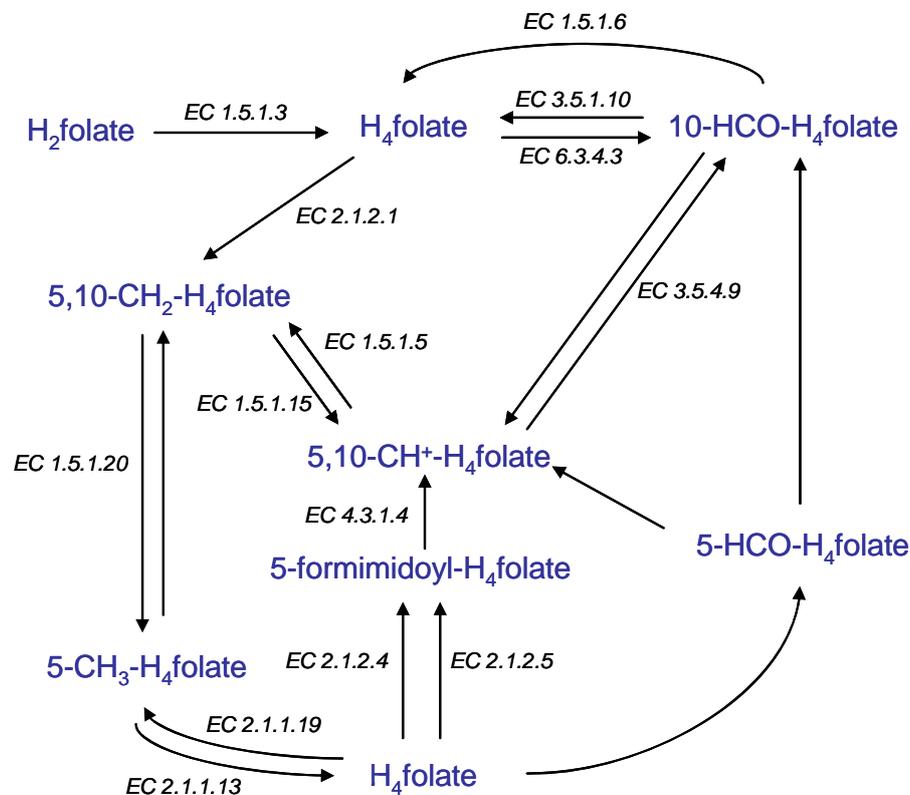


Figure 6 : Interconversion enzymatique des différents vitamères de folate

EC 1.5.1.3 : Dihydrofolate réductase

EC 1.5.1.5 : Méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (NADP⁺)

EC 1.5.1.6 : Formyltétrahydrofolate déshydrogénase

EC 1.5.1.15 : Méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (NAD⁺)

EC 1.5.1.20 : Méthylènetétrahydrofolate réductase [NAD(P)H]

EC 2.1.1.13 : Méthionine synthase

EC 2.1.1.19 : Triméthylsulfonium-tétrahydrofolate N-méthyltransférase

EC 2.1.2.1 : Glycine hydroxyméthyltransférase

EC 2.1.2.4 : Glycine formimidoyltransférase

EC 2.1.2.5 : Glutamate formimidoyltransférase

EC 3.5.1.10 : Formyltétrahydrofolate déformylase

EC 3.5.4.9 : Méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase

EC 4.3.1.4 : Formimidoyltétrahydrofolate cyclodésaminase

EC 6.3.4.3 : Formatetétrahydrofolate ligase

1.2.5.1 Synthèse du tétrahydrofolate (H_4 folate)

Hormis la synthèse *de novo*, le H_4 folate peut être obtenu à partir de trois dérivés différents (Figure 7).

- Par la déshydrogénation du 10-HCO- H_4 folate par la formyltétrahydrofolate déshydrogénase. L'enzyme utilise comme cofacteur le $NADP^+$ et l'eau et libère du $NADPH + H^+$ et une molécule de CO_2 (réaction 1).
- Par réduction du H_2 folate par la dihydrofolate réductase (réaction 2).
- Par l'hydrolyse du groupement formyle du 10-HCO- H_4 folate par la formyltétrahydrofolate déformylase (réaction 3).
- A partir du 5- CH_3 - H_4 folate lors de la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine, par la méthionine synthase. La méthionine synthase est une enzyme qui a comme co-substrat la cobalamine (vitamine B12) (réaction 4).

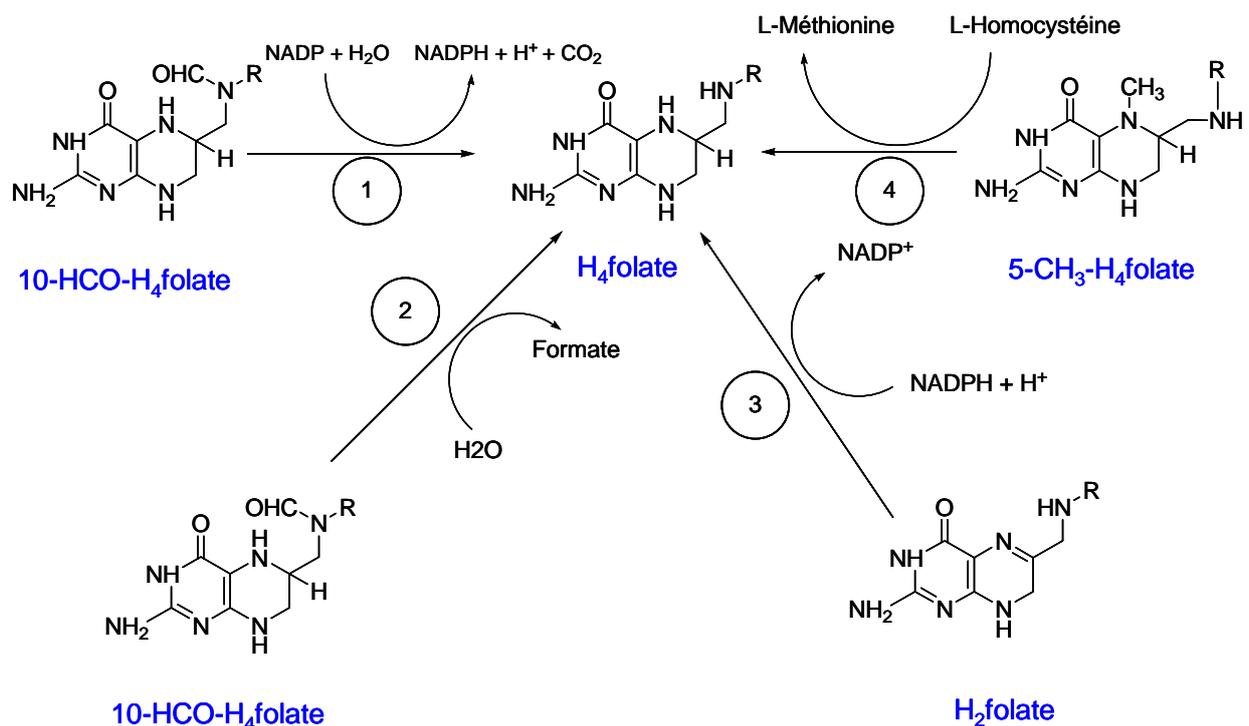


Figure 7 : Synthèse du H_4 folate

1 : Formyltétrahydrofolate déshydrogénase ; 2 : Formyltétrahydrofolate déformylase ; 3 : Dihydrofolate réductase ; 4 : Méthionine synthase

1.2.5.2 Synthèse de l'acide 10-formyltétrahydrofolique (10-HCO-H₄folate)

Le 10-HCO-H₄folate peut être synthétisé à partir de trois dérivés différents (Figure 8).

- Soit à partir du H₄folate par la formate-tétrahydrofolate ligase. La réaction enzymatique est ATP-dépendante et utilise comme co-facteur le formate. Dans cette réaction un phosphate inorganique est relargué (réaction 1).
- Par l'hydrolyse du 5,10-CH⁺-H₄folate par la méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase (réaction 2).
- Par l'interconversion chimique du groupement formyle porté par l'azote 5 du 5-HCO-H₄folate sur l'azote 10 du 10-HCO-H₄folate, couplée à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (réaction 3).

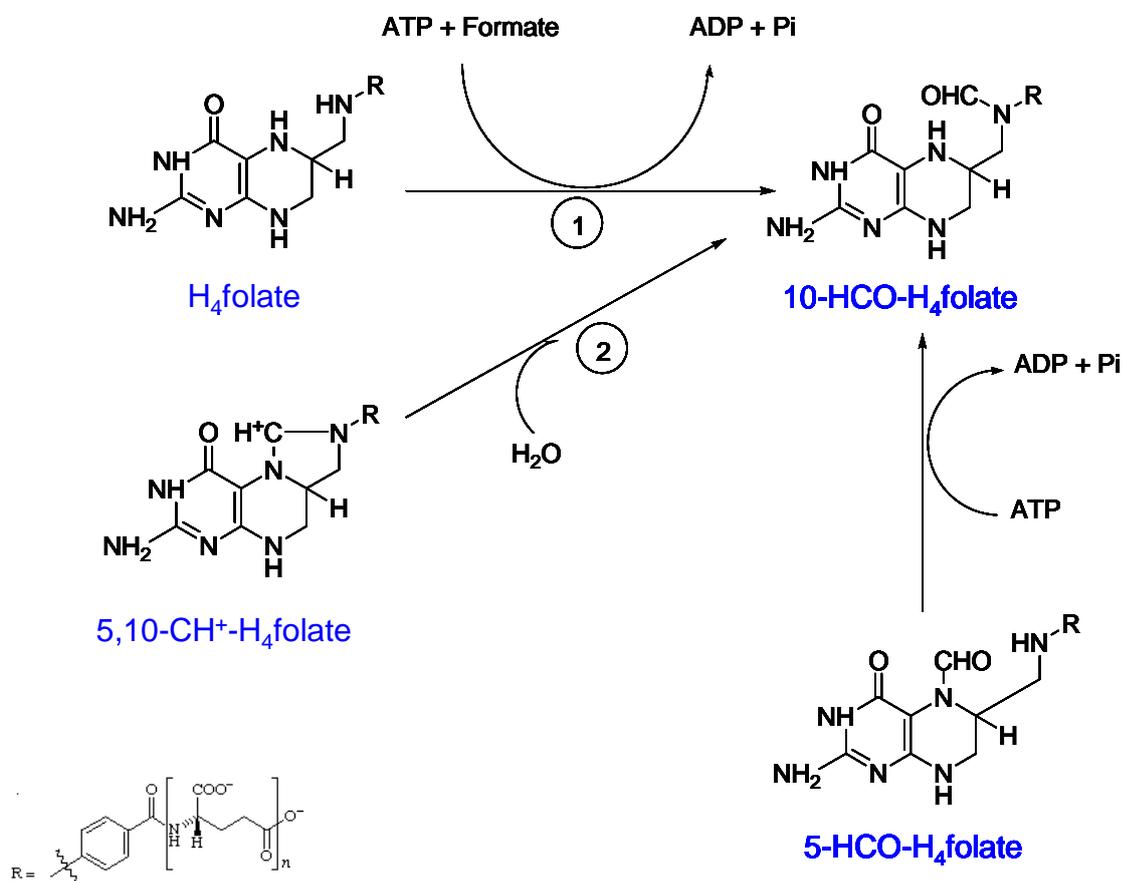


Figure 8 : Synthèse du 10-HCO-H₄folate

1 : formate-tétrahydrofolate ligase ; 2 : méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase

1.2.5.3 Synthèse de l'acide 5-formyltétrahydrofolique (5-HCO-H₄folate)

La synthèse du 5-HCO-H₄folate se fait à partir de la formylation du H₄folate, en présence de N-formyle-L-glutamate, dont le résidu L-glutamate sera relargué (Figure 9).

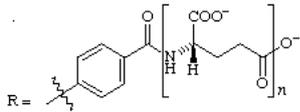
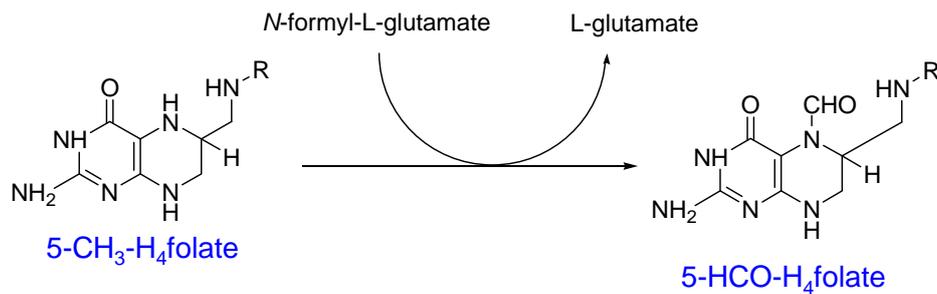


Figure 9 : Synthèse du 5-HCO-H₄folate

1.2.5.4 Synthèse de l'acide 5,10-méthényltétrahydrofolique (5,10-CH⁺-H₄folate)

Le 5,10-CH⁺-H₄folate peut être synthétisé à partir de 4 dérivés différents (Figure 10).

- Par hydrolyse du 10-HCO-H₄folate par la méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase (réaction 1).
- Par cyclisation du 5-HCO-H₄folate en présence d'ATP, par la 5-formyltétrahydrofolate cyclo-ligase (réaction 2).
- Par déshydrogénation du 5,10-CH₂-H₄folate par la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase. Cette réaction est dépendante de la réduction du NADP⁺ en NADPH (réaction 3) ou de la réduction du NAD⁺ en NADH (réaction 4).
- Enfin, à partir du H₄folate. Un groupement formimidoyl est transféré sur le H₄folate soit par la glutamate formimidoyltransférase (réaction 5) soit par la glycine formimidoyltransférase (réaction 6), avec comme co-facteur le N-formimidoylglutamate ou le N-formimidoylglycine respectivement. Au cours de la réaction, un glutamate ou une glycine seront relargués. Ces réactions forment le 5-formimidoyltétrahydrofolate qui sera désaminé et cyclisé par la formiminotétrahydrofolate cyclodésaminase (réaction 7).

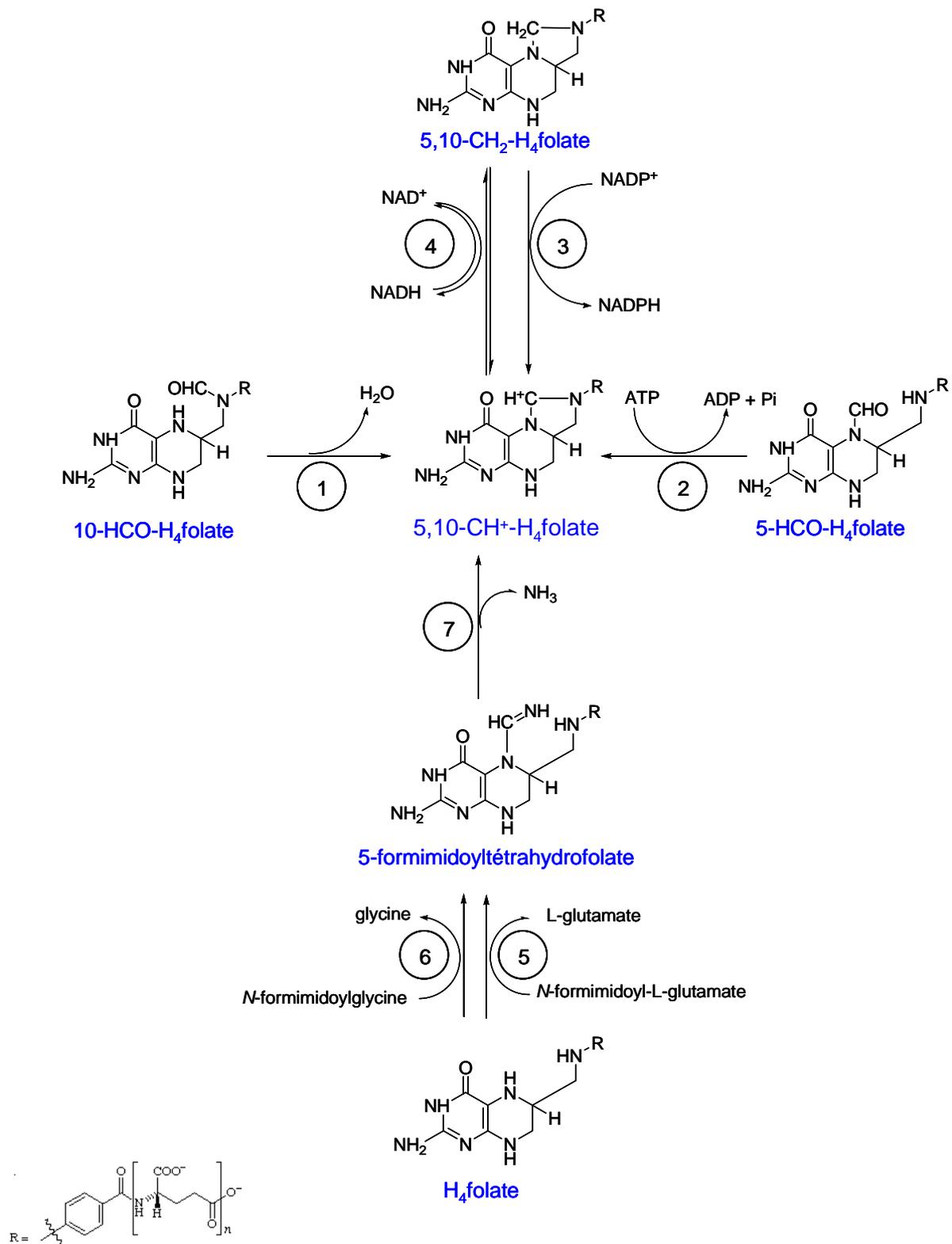


Figure 10 : Synthèse du 5,10-CH⁺-H₄folate

1 : méthényltetrahydrofolate cyclohydrolase ; 2 : 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase ;
 3 : méthylènetetrahydrofolate déshydrogénase (NADP⁺) ; 4 : méthylènetetrahydrofolate déshydrogénase (NAD⁺) ; 5 : glutamate formimidoyltransférase ; 6 : glycine formimidoyltransférase ; 7 :
 formimidoyltetrahydrofolate cyclodésaminase

1.2.5.5 Synthèse de l'acide 5,10-méthylènetétrahydrofolique (5,10-CH₂-H₄folate)

Le 5,10-CH₂-H₄folate peut être synthétisé à partir de trois dérivés (Figure 11).

- A partir du 5,10-CH⁺-H₄folate, par réduction du carbone lié à l'azote 5 et l'azote 10 par la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase. Cette réaction est couplée à l'oxydation du NADH en NAD⁺ (réaction 1).
- A partir du H₄folate par la méthylation et la cyclisation entre l'azote 5 et l'azote 10 par la glycine hydroxyméthyltransférerase. Cette enzyme a comme co-facteur la L-sérine qui va être transformée en glycine (réaction 2).
- A partir du 5-CH₃-H₄folate qui va être réduit et cyclisé par la méthylènetétrahydrofolate réductase. Cette réaction va dans un même temps réduire le NADP⁺ en NADPH avec libération d'un proton (réaction 3).

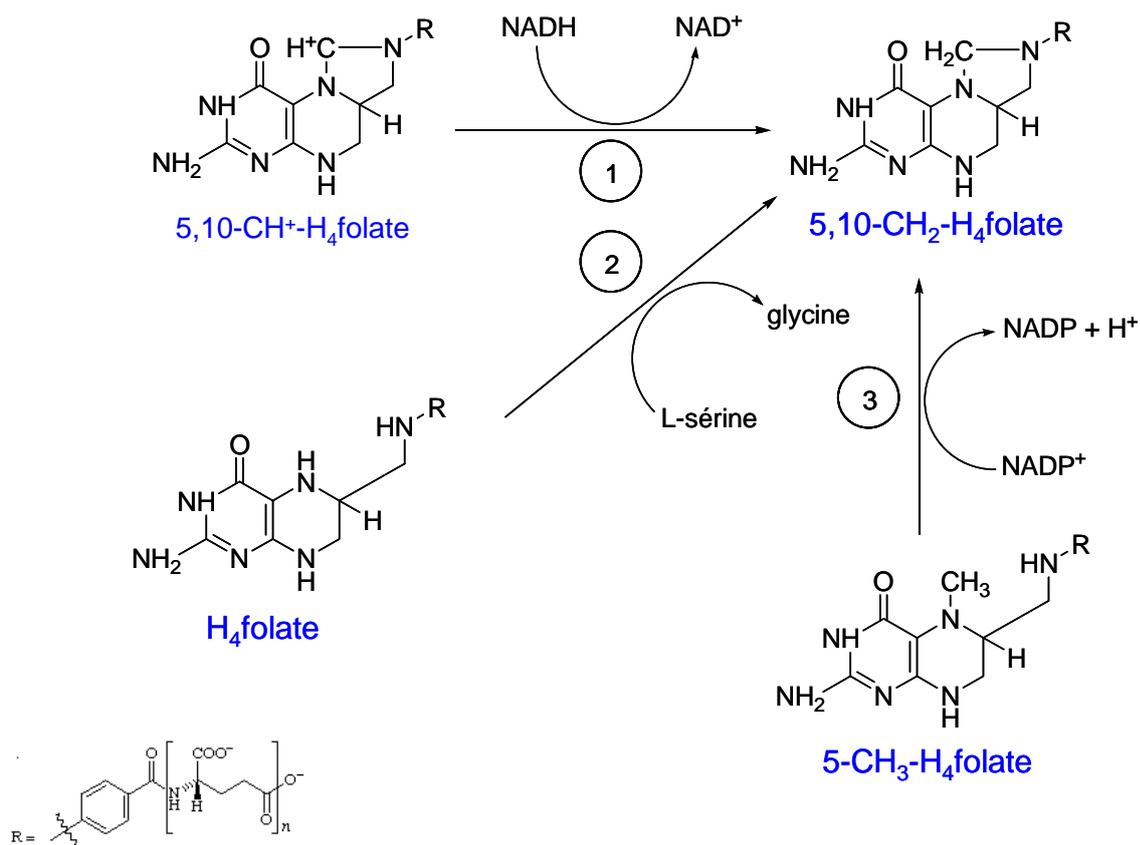


Figure 11 : Synthèse du 5,10-CH₂-H₄folate

1: méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase ; 2 : glycine hydroxyméthyltransférerase ; 3 : méthylènetétrahydrofolate réductase

1.2.5.6 Synthèse de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique (5-CH₃-H₄folate)

Le 5-CH₃-H₄folate peut être synthétisé à partir de deux dérivés (Figure 12).

- A partir du H₄folate par méthylation de l'azote 5 par la triméthylsulfonium-tétrahydrofolate-N-méthyltransférase. Cette réaction a comme cofacteur le triméthylsulfonium qui va être déméthylé en diméthylsulfide (réaction 1).
- A partir du 5,10-CH₂-H₄folate par réduction du méthylène par la méthylènetétrahydrofolate réductase. Cette enzyme est dépendante de la réduction du NADP⁺ en NADPH (réaction 2).

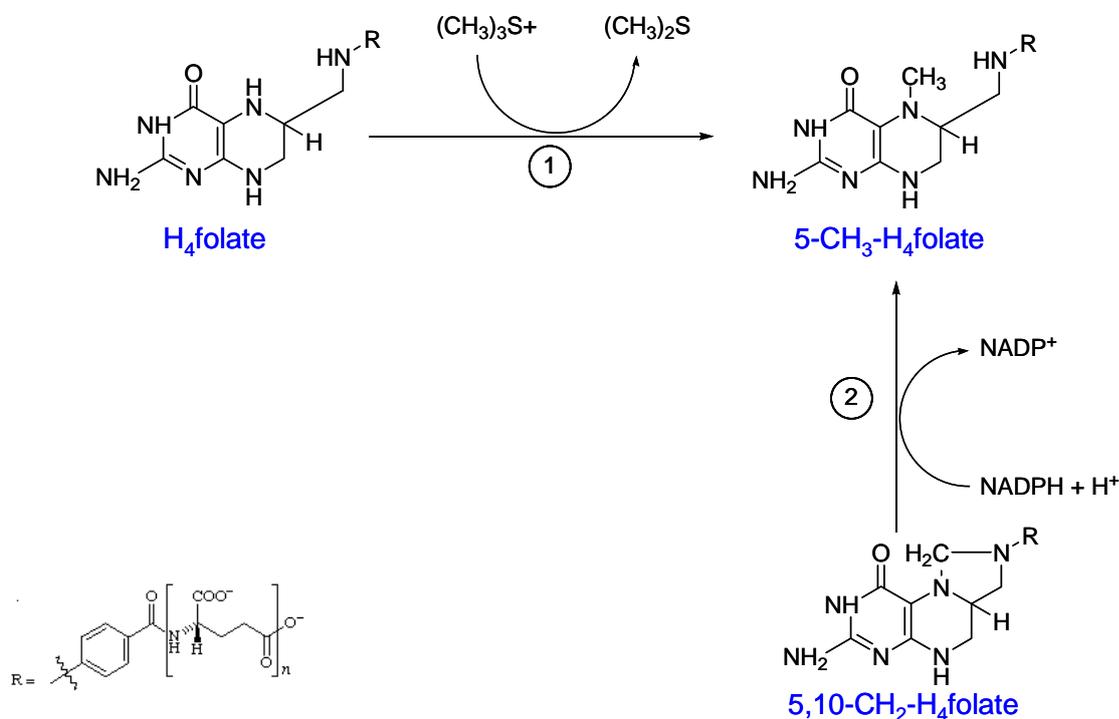


Figure 12 : Synthèse du 5-CH₃-H₄folate

1 : triméthylsulfonium-tétrahydrofolate N-méthyltransférase ; 2 : méthylènetétrahydrofolate réductase ; (CH₃)₃S⁺ : triméthylsulfonium ; (CH₃)₂S : diméthylsulfonium.

1.2.6 Conclusions

La synthèse des folates se fait à partir de deux précurseurs l'acide *para*-aminobenzoïque synthétisé dans le chloroplaste et le cycle ptérine synthétisé dans la mitochondrie. Les deux précurseurs sont associés dans la mitochondrie, la biosynthèse conduisant à la formation du H₄folate possédant une chaîne polyglutamate plus ou moins longue.

Les différents dérivés de folates sont synthétisés à partir du H₄folate via les interconversions enzymatiques.

1.3 Fonctions biologiques

Les folates sont impliqués dans le métabolisme monocarboné c'est-à-dire comme donneur de groupements carbonés. Les fonctions biologiques des folates sont portées par trois dérivés, qui sont spécifiquement impliqués dans la synthèse du panthoténate et du thymidilate pour le 5,10-CH₂-H₄folate, dans la synthèse de la méthionine et du S-adénosylméthionine pour le 5-CH₃-H₄folate et dans la synthèse des nucléotides et du formylméthionyl-ARNt pour le 10-HCO-H₄folate (Cossins *et al.*, 1997).

1.3.1 Synthèse du panthoténate et du thymidilate

Le 5,10-CH₂-H₄folate intervient comme donneur de groupement carbone dans la synthèse du panthoténate (vitamine B5). Le 5,10-CH₂-H₄folate est cofacteur de la transformation de l' α -cétisovalérate en cétopentoate par la cétopentoate hydroxyméthyltransférase (Julliard, 1994 ; Raman *et al.*, 2004). Le panthoténate est le précurseur du coenzyme A et de l'ACP (Acyl Carrier Protein).

Le 5,10-CH₂-H₄folate intervient en tant que cofacteur lors de la méthylation du désoxyuracile Monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). Lors de cette réaction, le 5,10-CH₂-H₄folate est déméthylé par la thymidilate synthase et réduit sous forme de H₂folate. La dTMP est une des quatre bases de l'ADN.

1.3.2 Synthèse de la méthionine et du S-adénosylméthionine

La méthionine peut être synthétisée au travers de deux voies métaboliques, la voie de recyclage de la S-adénosylméthionine et la voie *de novo* qui fait intervenir le 5-CH₃-H₄folate comme cofacteur.

Au cours de la réaction de méthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase, le 5-CH₃-H₄folate va être déméthylé en H₄folate. La réaction fait intervenir comme cofacteur la cobalamine (vitamine B12). La réaction est couplée à une deuxième réaction enzymatique qui fait intervenir la bêtaïne-homocystéine S-méthyltransférase. Le cofacteur de

cette réaction est la bétaine (issu de la choline), qui va être déméthylée en diméthylglycine (Cavuoto & Fenech, 2012).

La méthionine va être transformée en S-adénosylméthionine par la méthionine adénosine transférase, ATP dépendante. La S-adénosylméthionine est un métabolite qui tient lieu de donneur universel de groupements méthyles dans la totalité des réactions de méthylation de la cellule.

1.3.3 Synthèse des nucléotides et du formylméthionyl-ARNt

Lors de l'initiation de la traduction, le méthionyl-ARNt doit être formylé sur la méthionine. Cette réaction se fait par la méthionyl-ARNt formyltransférase qui utilise comme cofacteur le 10-HCO-H₄folate.

1.4 Compartimentation et trafic intracellulaire

Le système de transport des folates est bien connu chez les animaux mais peu chez les végétaux. La synthèse du H₄folate se fait dans la mitochondrie. Le « pool » de folates mitochondrial représente 30 % des folates totaux. Les vacuoles et les chloroplastes contiennent respectivement 10 et 20 % des folates cellulaires, les 40 % restant se trouvent dans la partie cytosolique (Rébeillé *et al.*, 2007). Le transport des folates vers les organites cellulaires se fait sous forme monoglutamate. Dans les cellules végétales, des transporteurs protéiques sont à la base de ces transports mais seul le transporteur de l'enveloppe plastidiale a été identifié. Le transport au travers de la membrane plastidiale peut se faire par le transporteur AtFOLT1, qui possède une structure analogue à celle des transporteurs mitochondriaux, ces derniers étant caractérisés par six hélices transmembranaires. Le deuxième transporteur identifié au niveau de la membrane plastidiale est de la famille des transporteurs des folates et biopéridines (Bedhomme *et al.*, 2005). Des transporteurs des folates sembleraient être impliqués dans le transport des folates au travers des membranes mitochondriales et vacuolaires (Bedhomme *et al.*, 2005).

Enfin, l'incorporation des folates à partir du milieu extracellulaire est possible (Prabhu *et al.*, 1998).

Chez l'Homme, deux types de transporteurs sont actuellement identifiés, le « Reduced Folate Carrier » (RFC) et le « Proton Coupled Folate Transporter » (PCFT). Ces transporteurs sont

notamment impliqués dans le transport des folates au niveau de la barrière épithéliale de l'intestin lors de leur absorption.

Le RFC est un transporteur ubiquitaire, notamment retrouvé au niveau des cellules intestinales, des hépatocytes, des cellules rénales, des cellules épithéliales et du plexus choroïde. Le RFC est un transporteur à 12 domaines transmembranaires. Le fonctionnement du transporteur n'est pas directement lié à l'hydrolyse de l'ATP, ni à un gradient de sodium ou de proton, mais dépend d'un gradient anionique transmembranaire, en particulier un gradient de phosphate organique. Le pH optimal de fonctionnement du transporteur est pH 7. Ce transporteur présente des affinités avec le 5-CH₃-H₄folate et le 5-HCO-H₄folate avec des Km d'environ 2 à 7 μM, par contre son affinité avec l'acide folique est très faible (Zhao *et al.*, 2009).

Le PCFT est un transporteur de folate à haute affinité, dont le pH optimal est faible. C'est un transport électrogénique par symport avec des protons. Le PCFT est localisé au niveau de l'intestin grêle, en particulier dans la partie proximale du jéjunum et du duodénum, au niveau des reins, du foie, du placenta, de la rétine, et du cerveau. La structure biochimique du transporteur n'est pas encore claire mais l'hypothèse la plus probable est un transporteur à 12 domaines transmembranaires (Zhao *et al.*, 2009).

1.5 Biodisponibilité

1.5.1 Absorption des folates

L'absorption des folates, présentée dans la Figure 13, se fait dans la partie proximale du jéjunum. La majeure partie des folates ingérés étant sous forme polyglutamate, la première étape de l'absorption est donc la déconjugaison des folates polyglutamates sous forme monoglutamate par la glutamate carboxypeptidase II. La glutamate carboxypeptidase II dont le pH optimal est de 6 à 7 (Mc Nulty & Pentieva, 2004) est localisée au niveau des cellules de la muqueuse intestinale (Zhao *et al.*, 2009).

Une fois sous forme monoglutamate, les folates sont transportés au travers de la barrière en brosse de l'intestin par le transporteur PCFT (décrit au paragraphe 1.4) Ce transport est couplé au système d'échange Na⁺/H⁺. Le transport des folates dans les entérocytes se fait uniquement via le transporteur PCFT, le transporteur RFC n'étant pas actif dans les conditions de pH de l'intestin. Une fois dans l'entérocyte, les différents dérivés vont être réduits et méthylés (Ohrvik & Witthoft, 2011) pour rejoindre la veine porte. L'export des

folates au travers de la membrane basale des entérocytes n'est pris en charge ni par le transporteur PCFT ni par le transporteur RFC. L'export des folates vers la veine porte serait assuré par le transporteur MRP 3 appartenant à la famille des « Multidrug Resistance Protein ». Une fois dans la veine porte, les folates seront transportés dans un premier temps vers le foie où ils seront soit polyglutamylés pour être stockés soit envoyés vers les organes cibles via la circulation entérohépatique (Zhao *et al.*, 2009).

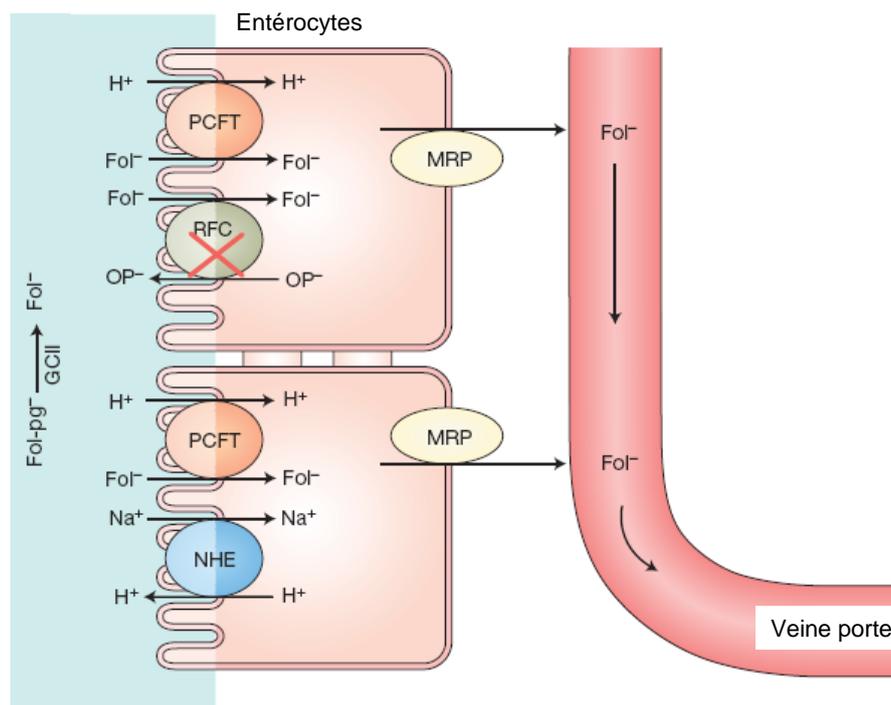


Figure 13 : Absorption des folates dans la partie proximale du jéjunum (d'après Zhao *et al.*, 2009)

PCFT : Proton Coupled Folate Transporter ; RFC : Reduced Folate Carrier ; MRP : Multidrug Resistance Protein ; NHE : Na^+/H^+ exchangers ; GCI : Glutamylcarboxypeptidase II ; Fol^- : folate monoglutamate ; Fol-pg^- : folate polyglutamate.

1.5.2 Biodisponibilité

La biodisponibilité des folates est définie comme la proportion de folates ingérés qui deviennent disponibles pour le métabolisme ou le stockage. Elle va dépendre, entre autre, de différents facteurs tels que la nature du dérivé, de la longueur de la queue polyglutamate, de la dose ingérée et de la matrice.

Une étude menée sur l'excrétion urinaire de différents dérivés deutérés conclut que l'acide folique est plus biodisponible que les autres formes de dérivés réduits (Gregory *et al.*, 1992).

Cependant des études contradictoires n'ont montré aucunes différences significatives entre la biodisponibilité de l'acide folique et celle des autres formes de dérivés réduits (McNulty & Pentieva, 2004). Un des problèmes majeurs de ces études est qu'il n'est pas possible de déterminer si les différences sont dues à des différences d'absorption des dérivés ou bien à des différences post-absorption, notamment dans la bioconversion.

Dans les aliments, les différents dérivés de folates sont présents sous forme de polyglutamates. La première étape de l'absorption est l'hydrolyse des résidus glutamates. Deux études menées sur l'excrétion urinaire pendant 24 h des folates ont montré qu'il n'y a pas de différences significatives dans la biodisponibilité des folates mono, tri ou heptaglutamates (Tamura *et al.*, 1976 ; Bailey *et al.*, 1988). Cependant, les formes heptaglutamates disparaissaient moins de la lumière intestinale que les formes monoglutamates (Brouwer *et al.*, 2001). Ceci a été confirmé par une étude menée avec des standards deutérés, qui a montré que la biodisponibilité des hexaglutamates est moindre que celle des monoglutamates (Gregory *et al.*, 1992). Bien que ces études ne soient pas sans équivoque, il semblerait que l'absorption des folates sous forme monoglutamate soit plus élevée que sous forme polyglutamate (Ohrvik & Witthoft, 2011).

Heseker & Schmitt (1987) ont montré que la concentration moyenne en acide folique dans le plasma sanguin atteint un plateau après 4 semaines de traitement avec des doses de 1 mg par jour. Malinow *et al.* (1998) ont montré qu'une dose de 127 µg d'acide folique par jour pendant 5 semaines était relativement plus efficace pour l'augmentation de la concentration en folate plasmatique que des doses de 499 µg par jour ou encore 665 µg par jour. Ces observations suggèrent qu'une faible dose d'acide folique augmente la concentration en folate plasmatique plus efficacement que de fortes doses.

Un des paramètres influençant la biodisponibilité des folates est la matrice alimentaire, qui peut impliquer à la fois des encapsulations et des liaisons des folates, limitant ainsi leur biodisponibilité. Le pourcentage de biodisponibilité mesuré par une courbe dose-réponse à partir de l'excrétion urinaire, est de 63 % pour les épinards, 37 % pour les tomates et 46 % pour la banane et 31 % pour le jus d'orange par exemple (Brouwer *et al.*, 2001). L'acidité de la matrice alimentaire influence la bioaccessibilité des folates. La bioaccessibilité des folates heptaglutamates, mesurée par comparaison avec celle de l'acide folique seul, diminue lors de l'ajout de 600 ml de jus d'orange. Cette diminution serait due à la diminution du pH par l'acidité du jus d'orange (environ 3,7) (Tamura *et al.*, 1976). Enfin, la structure de l'aliment lors de sa consommation va influencer la bioaccessibilité. La bioaccessibilité des folates à

partir d'épinard haché est plus élevée qu'à partir d'épinard en branche (Van Het Hof *et al.*, 1999 ; Castenmiller *et al.*, 2000).

1.6 Effets santé

Des études épidémiologiques ont montré des relations entre le statut vitaminique en folate et l'apparition de pathologies telles que les anomalies de fermeture du tube neural (Spina bifida), les maladies cardiovasculaires de type infarctus du myocarde, les cancers colorectaux et la maladie d'Alzheimer.

1.6.1 Anomalies de fermeture du tube neural

Les mécanismes biochimiques et génétiques reliant les folates et les anomalies de fermetures du tube neural ne sont pas encore mis à jour. Cependant, il est admis que l'apparition de la maladie serait due à une déficience dans le métabolisme des folates entraînant une déficience du métabolisme de la synthèse du dTMP ou de la méthionine (Stover, 2004). L'accumulation d'homocystéine, précurseur de la méthionine, entrainerait une diminution de la synthèse de l'ADN causée par une déficience de la synthèse du dTMP. Cette altération affecterait les cellules, notamment leurs proliférations et leurs migrations, au cours de la période critique de fermeture de la crête neurale (Fleming & Copp, 1998). De plus, une déficience dans la reméthylation de l'homocystéine résulterait en une augmentation du ratio S-adénosylHomocystéine/S-adénosylMéthionine, qui pourrait affecter la méthylation de l'ADN et par conséquent modifier l'expression de gènes nécessaires à la fermeture du tube neural. En France et en Europe, la fortification des aliments en folates n'est pas autorisée. Aux Etats-Unis, au Canada, au Chili, et au Costa Rica, la fortification est autorisée et a entraîné une nette augmentation du statut vitaminique en acide folique dans la population. Aux Etats-Unis, l'ajout de 150 µg d'acide folique pour 100 g de produit a induit une diminution de 19 % de la prévalence des maladies de fermeture du tube neural (Honein *et al.*, 2001). Au Canada, les mêmes teneurs en acide folique ajoutées aux aliments ont conduit à une diminution de l'apparition des maladies de fermeture du tube neural de 32 à 50 % (Tamura & Picciano, 2006). Au Costa Rica et au Chili, où les fortifications sont de 40 à 180 µg de folates pour 100 g de produit et 220 µg pour 100 g de produits céréaliers, la diminution de la prévalence a été de 35 % et 40 % respectivement (Tamura & Picciano, 2006). Cependant la supplémentation systématique des aliments en acide folique peut masquer un déficit en

cobalamine (Vitamine B12) entraînant des troubles neurologiques irréversibles (Stover, 2004). C'est pourquoi les autorités européennes n'autorisent pas la supplémentation systématique et préfèrent mettre en place des stratégies de préservation des folates dans les aliments.

1.6.2 Maladies cardiovasculaires

Le métabolisme des folates est très lié à celui de l'homocystéine. En effet, la conversion de l'homocystéine en méthionine est catalysée par la méthionine synthase dont le groupement carboné est donné par le 5-CH₃-H₄folate converti en H₄folate. Lorsqu'il y a une carence en folate, le métabolisme de l'homocystéine va être modifié entraînant une augmentation de l'homocystéine dans les cellules. L'homocystéine va alors migrer vers les vaisseaux sanguins où elle sera toxique pour les cellules épithéliales. Les mécanismes de toxicité sont encore mal connus à ce jour, mais certaines études suggèrent que l'homocystéine pourrait avoir une toxicité directe sur les cellules épithéliales des vaisseaux sanguins ou une toxicité par la potentialisation de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Kang, 2011).

Il a été bien mis en évidence que les folates diminuent le risque de maladies cardiovasculaires par la diminution du taux d'homocystéine plasmatique (Moat *et al.*, 2004). Il semblerait que les folates pourraient aussi avoir des effets bénéfiques sur les fonctions de l'endothélium vasculaire, notamment par le rôle d'antioxydant en chélatant les espèces réactives de l'oxygène (en particulier le radical superoxyde), mais aussi en stabilisant le tétrahydrobioptérine ou en le régénérant à partir de son produit d'oxydation le dihydrobioptérine (Moat *et al.*, 2004).

Une des manifestations cliniques liées à une forte carence en folates est l'apparition d'une anémie dite mégalo-blastique. En effet, une carence en folates entraîne un défaut de la synthèse des acides nucléiques, ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle cellulaire, provoquant ainsi des anomalies de la division cellulaire. Ce phénomène touche particulièrement les tissus présentant une forte division cellulaire et principalement les érythrocytes : les globules rouges sont moins nombreux mais présentent une taille supérieure à la normale, d'où le qualificatif "mégalo-blastique" (Aslinia *et al.*, 2006).

1.6.3 Cancer colorectaux

Des études épidémiologiques ont montré une augmentation d'environ 40% du risque de cancer du colon chez les individus qui ont un taux faible d'apport journalier en folates. Su et

Arab (2001) indiquent dans leur cohorte de 14 000 sujets une diminution du risque de cancer du colon de 43 % pour les individus dont la dose journalière en folates est supérieure à 246 µg comparé aux individus dont la dose journalière est de 103 µg. Cependant, une étude cas / témoin n'a pas trouvé d'association entre le risque d'apparition de cancers colorectaux et l'apport en folates avec 362 sujets comparés à 426 contrôles. Dans ce travail, les auteurs ont simplement noté qu'un faible apport en folates augmente le risque d'apparition d'adénomes colorectaux (Boutron-Ruault *et al.*, 1996 ; Tarr & Pufulete, 2005).

1.6.4 Pouvoir antioxydant

Quelques études ont montré que les folates ont un pouvoir antioxydant. L'acide folique est capable de réagir avec les radicaux libres $^{\circ}\text{OH}$ et $\text{O}^{\circ-}$ (Joshi *et al.*, 2001). Les formes réduites sont capables de chélater l'ion peroxy-nitrite et donc inhiber la peroxydation des lipides (Nakano *et al.*, 2003), et l'acide folique présente une activité antioxydante dans le sang (Stocker *et al.*, 2003). Enfin, l'acide folique, le H₂folate, le H₄folate et le 5-CH₃-H₄folate ont la capacité de chélater l'ABTS^{•+}, le radical DPPH[•] et réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺, *in vitro*. L'acide folique montre un pouvoir antioxydant plus faible comparé aux dérivés réduits tels que le H₄folate, le H₂folate et le 5-CH₃-H₄folate (Gliszczynska-Swiglo, 2007).

1.7 Sources alimentaires et apports recommandés

1.7.1 Sources alimentaires

Les fruits et légumes représentent 40 % des apports en folates dans l'alimentation en France (étude INCA 2, Lafay, 2009). Cependant, d'autres sources en folates existent avec des concentrations plus ou moins élevées. Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 4.

Les teneurs en folates des épinards et des haricots verts sont développées dans les paragraphes 2.3 et 3.3 respectivement.

Les folates sont retrouvés en grande quantité dans les levures, les céréales et les produits boulangers. Les légumes secs présentent des concentrations en folates élevées. Cependant, ils sont consommés après trempage et cuisson dans l'eau, diminuant leur concentration par effet

de dilution. Les abats comme le foie, organe de stockage des folates montrent des teneurs en folates élevées.

Les légumes secs et les abats présentent des concentrations en folates élevées. Cependant leur consommation reste faible vis-à-vis d'autres aliments comme les légumes verts, où les concentrations en folates varient de $0,65 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les petits pois à $1,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les épinards.

**Tableau 4 : Teneurs en folates présentes dans différents aliments
(Souci, Fackmann & Kraut, 2000)**

Aliments	Teneurs (mg/kg de matière fraîche)
<i>Céréales et produits céréaliers</i>	
Pain	1
Blé	18
Orge	0,65
Avoine	0,33
Maïs	0,26
Seigle	1,43
Riz	0,97
<i>Levures</i>	
Levure de boulanger	7,16
Levure de bière (déshydratée)	32
<i>Poissons</i>	
Thon	0,15
Saumon	0,05
<i>Produits carnés</i>	
Veau (muscle)	0,05
Porc (muscle)	0,025
Bœuf (foie)	2,6
Bœuf (muscle)	0,1
<i>Produits lactés</i>	
Lait de vache UHT	0,047
Camembert	0,6
<i>Produits avicoles</i>	
Poulet	0,012
Œuf	0,46
<i>Légumes</i>	
Epinards	1,9
Brocolis	1,07
Choux fleur	0,88
Choux de Bruxelles	1,01
Poireau	1,03
Laitue	1,4
Avocat	0,88
Carotte	0,26
Betterave rouge	0,83
<i>Légumineuses</i>	
Haricots verts	0,7
Petit pois	0,65
Lentilles	1,8
Pois chiche	3,4
<i>Agrumes</i>	
Orange	0,29
Pamplemousse	0,11
<i>Fruits</i>	
Pomme	0,03
Abricot	0,036
Pêche	0,037
Tomate	0,14
<i>Baies</i>	
Myrtilles	0,29
Framboise	0,3
Cassis	0,88
Raisin	0,04

1.7.2 Apports recommandés

En France, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) recommande une prise de 330 µg par jour pour les adolescents de 16 à 19 ans et les hommes adultes, 300 µg par jour pour les adolescentes de 16 à 19 ans et les femmes adultes. Pour les femmes enceintes ou en phase d'allaitement les recommandations augmentent à 400 µg par jour. Pour les nourrissons les apports recommandés sont de 70 µg par jour. Pour les enfants de 1 à 3 ans, 4 à 6 ans, 7 à 9 ans, 10 à 12 ans et 13 à 15 ans sont respectivement de 100, 150, 200, 250 et 300 µg par jour.

2. Les épinards

2.1 Aspects botaniques

L'épinard (*Spinacea oleracea*) (Figure 14) est une plante potagère, annuelle ou bisannuelle, de la famille des Chénopodiacées. Originaire de l'Iran, il a été introduit en France au début du XIIIe siècle, puis popularisé à la renaissance par Catherine de Médicis (Pitrat & Foury, 2003).



Figure 14 : Plant d'épinards (source : <http://amapplasemence.eklablog.com>)

Aujourd'hui il est cultivé dans toutes les régions tempérées pour ses qualités nutritionnelles et gustatives. L'épinard est une plante dioïque, c'est-à-dire que des pieds différents portent soit

des fleurs mâles soit des fleurs femelles. La pollinisation se fait par le vent et le pollen, très petit et léger, se transporte sur des kilomètres. Ceci explique pourquoi les fleurs sont elles-mêmes petites et vertes, ne cherchant pas à attirer les insectes pour sa reproduction.

2.2 *Culture et production industrielle*

Les stades de croissance de l'épinard sont peu nombreux et basés sur le nombre de feuilles. Après une phase d'installation de la culture qui prend entre 2 et 5 semaines, la croissance de la plante devient exponentielle. La biomasse foliaire double alors tous les sept jours.

La levée de la plante doit être homogène et la densité suffisante pour garantir une bonne qualité de la récolte. S'en suit le stade deux feuilles vraies, c'est-à-dire quand la seconde feuille fait plus de 4 cm, puis le stade quatre feuilles vraies, où les plantes ne recouvrent pas encore le sol. C'est à partir de ce stade que la croissance de l'épinard va s'accélérer. Sa récolte va être définie par le début de la montée en graines des plantes.

De nombreux types de sol conviennent pour la culture de l'épinard, il suffit juste que le pH soit proche de 7 pour éviter le blocage de la culture.

Comme toutes les Chénopodiacées, l'épinard est une plante nitrophile qui a besoin de beaucoup d'azote pour se développer. Ses besoins en azote sont estimés à environ 200 kg par hectare. En fin de cycle, la culture assimile 10 kg d'azote par hectare et par jour. La limitation en azote conduit au jaunissement des feuilles et à une montée à graines prématurée. L'épinard nécessite aussi un important apport de potassium, environ 410 kg par hectare.

L'épinard a un besoin de 120 à 150 mm d'eau pour accomplir son cycle de végétation. Sa consommation en eau suit son développement, modéré jusqu'au stade huit feuilles qui s'intensifie par la suite pour devenir maximal au cours des 15 derniers jours avant la récolte.

C'est dans la moitié nord de la France que se concentrent les cultures destinées à la transformation. La Bretagne, la Picardie et le Nord-Pas-de-Calais constituent les principales régions productrices. La région Centre est une zone mineure de production d'épinard pour la transformation. Pour le marché du frais, la zone productrice est située dans le Sud Est.

Environ 6000 hectares sont consacrés chaque année à la culture de l'épinard en France. Sur ces 6000 hectares, entre 4500 et 5000 hectares sont destinés à l'industrie. Le Tableau 5 montre qu'en cinq ans, de 2007 à 2011, les surfaces de production sont restées quasiment constantes. La production entre 2007 et 2011 a été de 102 000 à 93 000 tonnes. Environ 65%

de la production est destinée à la production de produits surgelés, alors que 18 % de la production est destinée à la fabrication de produits en conserves (source Unilet).

Tableau 5 : Production d'épinards pour l'industrie de la transformation

	2007	2008	2009	2010	2011
Surface (x 1000 ha)	4,8	4,7	3,9	4,1	4,2
Production (x 1000 t)	102,3	91,2	77	70,65	93,5
Conserves (x 1000 t 1/2b)	19	18	15	13	15
Surgelés (x 1000 t)	57	54	55	52	66

Divers pathogènes et ravageurs peuvent attaquer les cultures d'épinard et affaiblir la production. Les principales maladies de la plante résultent de l'attaque par des champignons tels que *Colletotrichum dematium*, responsable de l'athracnose et *Peronospora farisonosa* responsable du mildiou. Les principaux ravageurs sont des insectes tels que la mouche des semis (*Phorbia platura*, *Delia platura* ou *Pegomyia betae*) et les pucerons.

2.3 Valeur nutritionnelle

Les épinards sont principalement composés d'eau (915 g.kg⁻¹ de matière fraîche (MF)), de protéines (26,5 g.kg⁻¹ de MF), de fibres (25,8 g.kg⁻¹ de MF), de minéraux (16,9 g.kg⁻¹ de MF), de sucres (6,1 g.kg⁻¹ de MF), de lipides (3,0 g.kg⁻¹ de MF), d'acides organiques (0,8 g.kg⁻¹ de MF), et de vitamines. Les principales vitamines présentes dans les épinards sont la vitamine C, les caroténoïdes, notamment le β-carotène, la vitamine E (Tableau 6).

Tableau 6 : Valeur nutritionnelle des épinards (d'après Souci Fachmann et Kraut, 2000)

Vitamines	Quantité (mg.kg ⁻¹ de MF)
Caroténoïdes totaux	48
<i>α-carotène</i>	<i>traces</i>
<i>β-carotène</i>	48
Tocophérols totaux	23
<i>α-tocophérol</i>	13
<i>γ-tocophérol</i>	1,2
<i>δ-tocophérol</i>	8,2
Vitamine K	3,7
Vitamine B1	0,92
Vitamine B2	2,02
Nicotinamide	6,20
Panthoténate	2,50
Vitamine B6	2,21
Biotine	0,06
Folates	1,45
Vitamine C	510

Des études menées, notamment sur l'impact des procédés de transformation, que nous aborderons dans un chapitre suivant, ont déterminé les teneurs en folates dans les épinards (Tableau 7). Ces teneurs ont été déterminées par différents dosages, des dosages microbiologiques, des dosages après réduction des différents dérivés et analyse en HPLC avec une détection en fluorimétrie ou rarement par LC-MS pour identifier et quantifier les différents dérivés de folates. Les teneurs en folates dans les épinards crus varient de 0,96 à 3 mg.kg⁻¹ de matière fraîche. Ces variations peuvent être dues à la méthode analytique elle-même, ainsi les dosages microbiologiques donnent en général des teneurs plus élevées, mais aussi aux différences de variété et d'échantillonnage qui sont très peu mentionnées dans la littérature.

Tableau 7 : Concentration en folates totaux et en certains dérivés dans les épinards (mg.kg⁻¹ de MF)

Référence	Méthode	Folates totaux	5-CH ₃ -H ₄ folate	H ₄ folate	5-HCO-H ₄ folate	10-HCO-PteGlu
Iwatani <i>et al.</i> (2003)	MA	3,02				
Lin & Lin (1999)		3,64				
Desouza & Eitenmiller (1986)		2,00				
Chen (1983)		2,51				
Mullin (1982)		2,84				
Aiso (1998)		1,98				
Shresta <i>et al.</i> (2000)		2,24				
Leichter <i>et al.</i> (1979)		1,93				
McKillop <i>et al.</i> (2002)		1,42				
<i>Moyenne Dosage MA</i>		2,35				
Konings <i>et al.</i> (2001)	LC-FD	1,00				
Muller (1993)	LC-FD	1,44				
Hefni <i>et al.</i> (2010)	LC FD	1,29	0,79	0,31		0,24
Holosava <i>et al.</i> 2008	LC FD		0,87			
<i>Moyenne Dosage LC-FD</i>		1,24				
Zhang <i>et al.</i> 2005	LC-MS/MS		0,84	0,44	0,32	0,03
Rychlik 2004	SIDA	0,96 – 1,59				

MA : dosage microbiologique ; LC-FD : dosage par HPLC avec détection en fluorimétrie ; LC-MS/MS : dosage par HPLC avec détection par spectrométrie de masse ; SIDA : dosage par dilution d'isotopes stables.

3. Les haricots verts

3.1 Aspects botaniques

Le Haricot, ou Haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) (Figure 15), est une plante annuelle de la famille des fabacées, couramment cultivée comme légume. On en consomme soit le fruit (la gousse), soit les graines. Cette plante, originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud (Andes) aurait été introduite en Europe par Christophe Colomb qui l'aurait découvert à Cuba lors de son premier voyage en octobre 1492. C'est Catherine de Médicis qui l'aurait introduite en France à l'occasion de son mariage avec le roi Henri II en 1533 (Pitrat & Foury, 2003). Le haricot est une plante herbacée, annuelle, qui peut prendre plusieurs types de port

selon les variétés. On distingue deux grands groupes, les haricots grimpants dits haricots à rames, au port volubile, qui sont proches du type original, et les haricots nains à port érigé.



Figure 15 : Plant de haricot vert nain (Photo : D. Page)

Les tiges grimpantes des haricots sont peu ramifiées et s'enroulent autour de leur support dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Elles peuvent atteindre deux à trois mètres de haut. Les types nains sont plus ramifiés, prenant un port buissonnant ou dressé, de 40 à 60 cm de haut. Ils se prêtent mieux à la mécanisation des cultures.

Le haricot a une racine principale non dominante qui est très rapidement complétée de racines latérales. Les racines peuvent atteindre un mètre de profondeur si le sol s'y prête.

Les feuilles adultes sont pétiolées, alternes et composées trifoliées, de couleur verte ou pourpre. Les folioles ont une forme ovale-acuminée, presque losangée et ont de 6 à 15 cm de long sur 3 à 11 cm de large. Les pétioles, renflés à la base (coussinet foliaire ou pulvinus) sont munis de stipules, et de petites stipules ou stipelles se trouvent à la base des pétiolules supportant les folioles. Les deux feuilles primordiales qui apparaissent immédiatement au-dessus des cotylédons sont entières et opposées.

Les fleurs sont groupées en grappes déterminées (racèmes) de 4 à 10 fleurs, naissant à l'aisselle des feuilles. Ce sont des fleurs hermaphrodites, zygomorphes, au calice formé de

cinq sépales soudés présentant cinq dents regroupées en deux lèvres, à la corolle caractéristique, formée de cinq pétales inégaux et très différenciés. La couleur des pétales varie du blanc verdâtre au carmin.

Les fruits sont des gousses déhiscentes, appelées également « cosses », de forme et de longueur variable, dont la couleur varie du jaune, pour les haricots beurre, au violet, mais généralement verte. Leur section peut être cylindrique, ovale ou aplatie (haricots plats). Chaque gousse contient 4 à 8 graines de taille et de forme variable. La forme la plus commune est dite « réniforme », typique des haricots, mais on peut rencontrer des grains plus sphériques. Ce sont des graines exalbuminées, c'est-à-dire sans albumen, qui contiennent un embryon à deux cotylédons volumineux dans lesquels s'accumulent les réserves nécessaires à la croissance future de la plantule avant que le relais ne soit pris par les premières feuilles chlorophylliennes.

3.2 Culture et production industrielle

Le haricot vert est une légumineuse à cycle court, entre 65 et 70 jours, dont les besoins en chaleurs sont importants.

Les stades de développement se composent de la levée (entre 6 et 10 jours), le stade une feuille trifoliée (18 jours), le stade trois feuilles trifoliées (30 jours), la floraison (40 jours) et la récolte des gousses immatures aux alentours des 65 à 70 jours.

La température minimale dans le sol pour assurer la germination puis la croissance doit être comprise entre 10 et 12 °C. L'optimum de température se situe entre 20 et 30 °C. Au-delà de 32/33 °C, la plante peine à suivre la demande climatique (consommation en eau) et la chaleur perturbe la floraison (problème de pollinisation, avortement de gousse et de grain, induction de fil précoce). Les températures trop hautes ou trop basses sont toujours à l'origine de dépressions de la gousse : apparition de fils, déformations, formation du grain, décolorations, raccourcissement.

Le haricot vert s'accommode de nombreux types de sols du moment que ses besoins en eau soient pourvus et que la rotation soit adaptée. La culture du haricot vert peut se faire sur des sols à texture très diverse si le pH est compris entre 6 et 7,5 pour ne pas risquer de blocage de l'alimentation minérale de la plante.

Les demandes en azote et potassium sont de 160 kg par hectare. La demande en azote et potassium augmente très fortement à partir de l'apparition des bourgeons floraux jusqu'à la récolte.

La France est le premier producteur européen de haricot vert pour la transformation, avec près de 50 % des surfaces totales. Les contrats de culture représentent environ 27 000 hectares chaque année. Ils fournissent en moyenne 300 000 tonnes de gousses, dont 57 % sont destinés à la conserve et 43 % à la surgélation. Les cultures se répartissent, à parts relativement égales, entre trois grands bassins de production : la Bretagne, le bassin Nord Picardie Bourgogne Centre, et le Sud ouest (source Unilet).

Cependant, la production de haricots verts entre 2007 et 2011 a légèrement diminué avec un maintien des surfaces utilisées. Parallèlement à cela, les quantités fournies à la conserverie ou à la surgélation ont augmenté, comme présenté dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Production de haricots verts pour l'industrie de la transformation

	2007	2008	2009	2010	2011
surface (x 1000 ha)	28,7	28,9	26,5	23,9	24,9
Production (x 1000 t)	316.2	343	318.5	300.2	296.3
Conserves (x 1000 t 1/2b)	117	159	146	123	138
Surgelés (x 1000 t)	57	80	76	49	69

Les haricots verts peuvent subir des attaques du semis à la récolte, qui impacteront sur la qualité finale du légume ainsi que sur les rendements de production. Trois grands types de maladies peuvent toucher les haricots verts, les maladies du sol, les maladies de la végétation et les ravageurs. Les maladies du sol sont principalement dues à des champignons (des *Pythium*, *Fusarium solani*, *rhizoctone*) qui ont comme principal effet de détruire les racines des semis. Les maladies de la végétation sont causées par des champignons (*Botrytis cinerea*) des bactéries (*Pseudomonas*) ou des virus (Virus I) entraînant des lésions au niveau des feuilles et des gousses. Enfin, les ravageurs connus sont principalement des mouches, des pucerons, et la pyrale du maïs.

3.3 Valeur nutritionnelle

Les haricots verts sont principalement composés d'eau (895 g.kg⁻¹ de matière fraîche (MF)), de sucres (50,9 g.kg⁻¹ de MF), de protéines (23,9 g.kg⁻¹ de MF), de fibre (18,9 g.kg⁻¹ de MF), de minéraux (7,0 g.kg⁻¹ de MF), de lipides (2,4 g.kg⁻¹ de MF), d'acides organiques (2,0 g.kg⁻¹ de MF), et de vitamines principalement la vitamine C, des caroténoïdes, des tocophérols, panthoténate et vitamine B6 (Tableau 9).

Tableau 9 : Valeur nutritionnelle des haricots verts (source Souci, Fackmann & Kraut, 2000)

Vitamines	Quantité (mg.kg ⁻¹ de MF)
Caroténoïdes totaux	3,79
<i>α</i> -carotène	0,05
<i>β</i> -carotène	3,23
Vitamine E	1,32
Tocophérols totaux	4,23
<i>α</i> -tocophérol	1,03
<i>γ</i> -tocophérol	2,90
<i>δ</i> -tocophérol	0,03
Vitamine K	0,04
Vitamine B1	0,07
Vitamine B2	1,11
Nicotinamide	5,70
Panthoténate	5,0
Vitamine B6	2,64
Biotine	0,007
Folates	0,07
Vitamine C	190

Très peu d'études ont été publiées sur les teneurs en folates dans les haricots verts. Les teneurs en folates dans les haricots verts sont de 0,37 à 0,78 mg.kg⁻¹ de matière fraîche et sont reportées dans le Tableau 10. La variation des teneurs, comme pour les épinards, peut être due à la méthode analytique elle-même ou bien à l'état et la variabilité du matériel végétal frais, dont les caractéristiques sont peu mentionnées dans la littérature.

Tableau 10 : Concentrations en folates et en certains dérivés dans les haricots verts

Référence	Méthode	Total folate mg.kg ⁻¹ (MF)	5-CH ₃ -H ₄ folate	H ₄ folate	5-HCO-H ₄ folate mg.kg ⁻¹ (MF)	10-HCO-PteGlu	PteGlu
USDA Melse	MA	0,37					
Boonstra <i>et al.</i> 2002	MA	0,39					
<i>Moyenne dosage microbiologique</i>		0,38					
Muller 1993	LC-FD	0,70					
Rychlik <i>et al.</i> 2007	SIDA	0,37 0,52 0,78	0,12	0,25	≈ 0,02	≈ 0,02	≈ 0,02
<i>Moyenne dosage SIDA</i>		0,56					

MA : dosage microbiologique ; LC-FD : dosage par HPLC avec détection en fluorimétrie ; LC-MS/MS : dosage par HPLC avec détection par spectrométrie de masse ; SIDA : dosage par dilution d'isotopes stables.

4. Les procédés de transformation dans les industries agroalimentaires

4.1 La congélation

La congélation est un procédé qui consiste à abaisser la température du produit afin de limiter au plus les réactions métaboliques et limiter la croissance des microorganismes. La congélation conduit à la formation de cristaux de glace dans les aliments, processus que l'on appelle la nucléation.

4.1.1 La nucléation

Pour l'eau pure, la glace se transforme en eau à 0 °C à pression atmosphérique. Inversement, lorsque l'on refroidit de l'eau pure en glace, la nucléation se fait à une température inférieure à 0 °C, ce phénomène est appelé la surfusion. La nucléation est favorisée par les sels insolubles et les particules solides, c'est pourquoi la surfusion dans les aliments est relativement faible.

La nucléation et la taille des cristaux de glace formés vont être dépendantes de la vitesse de congélation. A une température proche du point de fusion, la nucléation va être lente et les cristaux formés de grande taille. A la fin de la congélation, les cristaux seront peu nombreux et de grande taille. Inversement lorsque la température de congélation sera faible, la

nucléation va être rapide et les cristaux de glace formés seront nombreux. A la fin de la congélation, les cristaux seront nombreux et de petite taille.

4.1.2 Etapes de la congélation

La congélation d'un aliment est divisée en trois étapes, comme illustré dans la Figure 16.

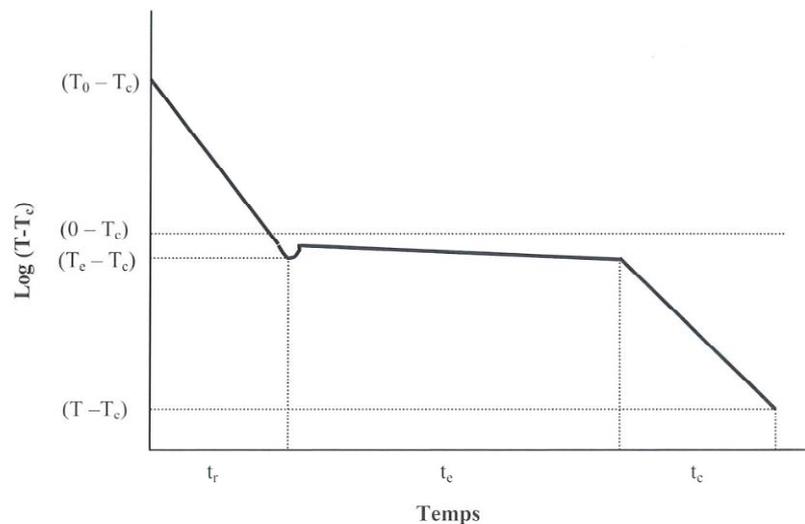


Figure 16 : Courbe de congélation d'un aliment (d'après Bazinet & Castaigne, 2011).

T_0 correspond à la température initiale du produit, T_c à la température de congélation ; T_e à la température de changement d'état de l'eau.

La première phase correspond au refroidissement de l'aliment de sa température initiale jusqu'au point de changement de l'état de l'eau, pendant le temps de refroidissement t_r . La deuxième étape correspond au changement d'état de l'eau qui passe de l'état liquide à l'état solide. Pendant cette période, la chaleur latente de changement d'état est absorbée et le produit varie peu en température. Cette phase dure un temps t_e qui est le temps de changement d'état de l'eau. Enfin, la troisième étape correspond à la descente en température du produit jusqu'à la température consigne. Cette étape dure un temps t_c , temps de congélation du produit (Bazinet & Castaigne, 2011).

Dès que la congélation du produit débute, il y a un front de congélation qui progresse de la surface ($x = 0$) vers le centre du produit ($x = D/2$) (Figure 17). Si la température à la surface est T_s et la température du front de congélation est T_e , deux transferts de chaleur se produisent simultanément : un transfert de chaleur externe par convection et un transfert de chaleur interne par conduction (Bazinet & Castaigne, 2011).

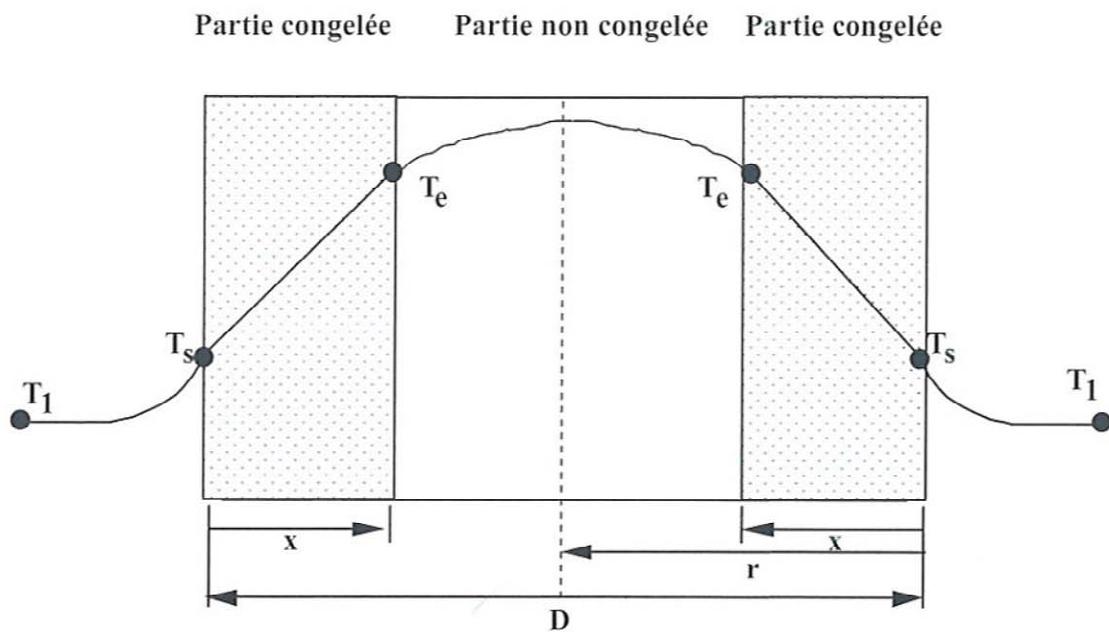


Figure 17 : Congélation d'une tranche de produit (d'après Bazinet & Castaigne, 2011).

D correspond à l'épaisseur du produit, T_e à la température de congélation commençante, T_1 à la température du milieu réfrigérant, T_s à la température de surface et x est le front de congélation. $r = D/2$.

4.1.3 Cas particulier de la congélation des tissus végétaux

Les systèmes végétaux comme les fruits et légumes sont majoritairement composés d'eau. Même si les mécanismes physiques élémentaires lors de la congélation de tissus végétaux sont identiques à ceux d'une solution aqueuse, l'organisation tissulaire modifie la dynamique du processus de congélation. Cette modification est principalement due à l'état de l'eau, l'eau libre et l'eau liée dans les tissus ainsi que sa répartition dans le milieu intra et extracellulaire.

Lors d'une congélation avec une vitesse lente, c'est-à-dire une vitesse de refroidissement inférieure à $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ par minute, la formation des cristaux de glace débute dans le milieu extracellulaire. Cette cristallisation du milieu extracellulaire va entraîner la déshydratation du milieu intracellulaire par plasmolyse des cellules. L'intérieur de la cellule va se concentrer en soluté pouvant ainsi provoquer des dommages cellulaires. Lors d'une congélation lente, il n'y a pas de formation de cristaux de glace à l'intérieur de la cellule végétale, les cristaux de glace sont de grosse taille, peu nombreux et dans le milieu extracellulaire. Cependant, il est possible de voir des cristaux dans le milieu intracellulaire, ils sont issus de la migration des cristaux du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire au travers de la paroi et de la membrane cellulaire (Bomben *et al.*, 1983).

Lors d'une congélation rapide, la nucléation et la cristallisation ont lieu alors que le transfert d'eau de l'intérieur vers l'extérieur des cellules végétales est faible. La formation de la glace intracellulaire reste encore mal maîtrisée, mais il est admis que la formation des cristaux endommage les membranes cellulaires, plus particulièrement au niveau des jonctions communicantes (« gap junctions ») ce qui permettrait la propagation de la glace (Acker *et al.*, 2001). La congélation rapide des tissus végétaux va entraîner la formation de nombreux cristaux de petite taille.

L'eau liée est impliquée dans des liaisons hydrogène avec des groupements polaires ou incluse dans des cages de groupement apolaire. L'eau liée peut être aussi plus ou moins associée à la matière sèche par des liaisons chimiques ou retenue par simple capillarité. Par conséquent l'eau liée peut être non congelable, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de formation de cristaux de glace quelque soit la température de refroidissement. Ce phénomène d'eau non congelable peut être dû au fait que la cristallisation est rendue impossible par l'inaccessibilité de l'eau dans des espaces trop étroits pour la formation de cristaux ou bien simplement par le fait de liaisons chimiques formées. La teneur en eau libre et en eau liée varie en fonction de la nature de l'aliment. Les épinards ont une teneur en eau totale de l'ordre de 90 %, le pourcentage d'eau congelée par rapport à la teneur en eau totale est de 88 % à -5 °C et 97 % à -30 °C. L'indicateur qui rend compte de la disponibilité de l'eau est l' A_w définie par le rapport entre la pression de vapeur de l'eau en équilibre avec le produit et la pression de vapeur saturante d'eau à la température du produit. L'eau est d'autant plus liée que l' A_w est proche de zéro.

Le facteur le plus important dans la congélation des fruits et des légumes ayant une forte teneur en eau est la vitesse de congélation. En effet, de la vitesse de congélation va dépendre la qualité du produit congelé final, avec un effet délétère des vitesses de congélation lentes.

4.1.4 Procédés de congélation

Il existe trois procédés de congélation qui sont, la congélation par courant d'air froid, la congélation par contact et la congélation par immersion ou aspersion. Pour ces trois types de procédés, la production de froid peut être réalisée soit mécaniquement soit cryogéniquement via l'utilisation de gaz liquide tels que l'azote ou le gaz carbonique (Bazinet & Castaigne, 2011).

Dans le procédé de surgélation des épinards que nous avons étudié, le type de congélateur utilisé est un congélateur à spirale avec une production de froid mécanique, présenté dans le chapitre 4.1.4.1.1.

4.1.4.1 Congélateurs à production de froid mécanique

4.1.4.1.1 Congélateur à air

L'air est refroidi au travers d'un évaporateur et poussé à l'aide d'un ventilateur vers l'aliment. Le produit peut être emballé ou non et peut présenter des tailles et des formes différentes. L'air pulsé sur le produit doit avoir une vitesse comprise entre 2 et 4 m.s⁻¹. La température dans ce type de congélateur est comprise entre -25 °C et -40 °C. La congélation à air peut être utilisée en continu dans des tunnels de surgélation à bande transporteuse, linéaire ou spiralee, ou discontinu en plaçant les produits dans des cellules de surgélation. Un type spécial de congélateur à air continu est le surgélateur à lit fluidisé qui consiste à envoyer un flux d'air sur les aliments de bas en haut. Ce type de congélateur est utilisé pour la surgélation des aliments de petite taille, comme les petits pois, afin d'éviter la formation de masse compacte par le maintien en suspension des aliments lors de la congélation (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.1.4.1.2 Congélateur par immersion

La congélation par immersion consiste à immerger l'aliment dans un fluide frigorigène. Le fluide frigorigène peut être de l'azote liquide ou du dioxyde de carbone, au contact de l'aliment le gaz frigorigène va s'évaporer et il sera reliquéfié et recyclé (Bazinet & Castaigne, 2011). Une solution de chlorure de sodium à concentration eutectique (23,1 %, température de -21 °C) peut aussi être utilisée comme fluide frigorigène.

4.1.4.1.3 Congélateur par contact avec une surface froide

Dans ce type de congélateur, l'aliment est refroidi par contact avec une surface froide, elle-même refroidie soit par un fluide frigorigène (solution de chlorure de sodium) soit par un gaz frigorigène (hydrochlorofluorocarbures) (Bazinet & Castaigne, 2011).

Ces types de congélateur sont utilisés pour la surgélation d'aliments en vrac, liquides ou semi liquides.

Deux types de congélateurs peuvent exister :

- Un congélateur à plaque, les plaques dans lesquelles circule un liquide frigorigère ou frigorigène sont placées horizontalement ou verticalement et espacées de 25 à 80 mm.
- Un congélateur à bande transporteuse et à tambour, l'aliment liquide ou pâteux est distribué sur une surface froide dans laquelle circule le fluide frigorigère ou frigorigène, à la sortie du tambour, l'aliment est raclé de la surface froide par un couteau.

4.1.4.2 Congélation cryogénique

L'utilisation de fluide cryogénique comme l'azote liquide et le dioxyde de carbone se fait dans des congélateurs de type tunnel à bande linéaire ou en spirale. L'aliment est mis en contact direct, par aspersion, avec le fluide cryogénique, le refroidissement se fait par consommation de la chaleur latente de vaporisation du fluide cryogénique (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.2 La stérilisation

Le but de la stérilisation est de détruire par la chaleur les microorganismes d'altération, les enzymes de dégradation (si le produit n'a pas été blanchi), et d'assurer une cuisson du produit. La stérilisation a pour effet de prolonger la durée de vie de l'aliment. La stérilisation des produits en conserve, liquides ou semi-liquides, se fait à partir de deux types d'autoclave, les autoclaves discontinus (appelés aussi autoclaves) et les autoclaves continus (appelés aussi stérilisateur).

Un cycle de stérilisation comporte quatre phases qui sont la purge, la montée en température, le maintien de la température et le refroidissement (Figure 18).

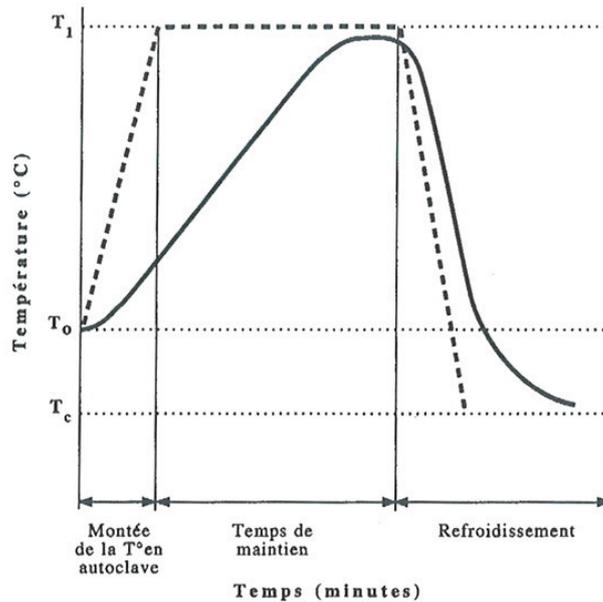


Figure 18 : Courbe de stérilisation (d'après Bazinet, 2011).

La courbe en pointillé représente la température dans l'autoclave, la courbe en trait plein représente la température dans la boîte. T_1 : Température de stérilisation ; T_0 : Température initiale ; T_c : Température de refroidissement.

La purge de l'autoclave a pour objectif de chasser l'air résiduel présent, par de la vapeur. En effet, l'air étant moins conducteur de chaleur que la vapeur, une présence résiduelle d'air entrainerait un traitement thermique hétérogène. A la fin de la purge, la température à l'intérieur de l'autoclave va monter jusqu'à atteindre la température de stérilisation. Une fois la température de stérilisation atteinte, elle est maintenue jusqu'à la phase de refroidissement.

La phase de refroidissement est la phase critique de la stérilisation pour les contenants du fait des chocs thermiques qui peuvent les endommager et du fait de la condensation brutale de la vapeur qui peut entrainer le bombage des boîtes (la pression interne étant plus élevée que la pression externe). Pour éviter cela, on utilise une contre pression d'air qui compense l'effet brutal de chute de pression de la vapeur (Bazinet & Castaigne, 2011).

Dans le cas du procédé d'appertisation des haricots verts que nous avons étudiés, le type de stérilisateur utilisé par l'industriel est un stérilisateur vertical hydrostatique, présenté dans le chapitre 4.2.2.

4.2.1 Autoclaves discontinus

Dans la stérilisation discontinue, les produits sont déposés dans des paniers qui sont introduits dans l'enceinte de stérilisation par des portes ou couvercles que l'on ouvre et ferme, d'où la

notion de discontinu. Trois types d'autoclaves discontinus sont rencontrés dans l'industrie agroalimentaire, les autoclaves statiques, les autoclaves rotatifs et les autoclaves à agitation (Shaka Process[®]) (Bazinet & Castaigne, 2011).

Dans la stérilisation à l'aide d'autoclaves statiques, les produits sont immobiles à l'intérieur de l'enceinte. La qualité du produit peut être altérée du fait de l'accumulation de chaleur à la périphérie de l'emballage conduisant à une sur-cuisson de cette partie.

Le deuxième type rencontré est le stérilisateur rotatif. Les paniers introduits dans l'enceinte sont agités par rotation. Cette rotation va induire une turbulence suffisante pour créer un transfert de chaleur rapide au point critique de la boîte. La rotation est culbutante et non axiale, c'est-à-dire que les paniers placés à l'intérieur de l'enceinte tournent sur eux même.

Enfin, les autoclaves peuvent avoir une agitation linéaire à haute vitesse ce qui est le cas pour le procédé Shaka Process[®].

Les autoclaves peuvent être horizontaux ou verticaux. Dans le cas des autoclaves verticaux, le fond de l'appareil est fixe et l'ouverture se fait par le haut. Le chargement des paniers dans l'autoclave se fait à l'aide d'un palan par le haut. Dans le cas des stérilisateurs horizontaux, l'ouverture se fait par l'une ou l'autre des extrémités et le panier est chargé dans l'enceinte à l'aide d'un chariot roulant.

Il existe trois grandes technologies de chauffage pour les autoclaves, la technologie par vapeur / air où la vapeur est injectée dans l'enceinte de l'autoclave pour la montée en température et le refroidissement se fait par injection d'eau ; par aspersion d'eau où l'eau chaude vaporisée sur les produits par des buses situées sur le haut et les côtés de l'enceinte ; par immersion où les produits sont immergés dans l'eau (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.2.2 *Autoclaves continus*

Les autoclaves continus sont conçus pour réaliser en régime permanent l'introduction de produits identiques dans une enceinte stérilisatrice et les laisser pendant un temps de palier déterminé en fonction de la valeur stérilisatrice recherchée, puis de les ressortir en les ramenant aux conditions de température initiale.

Le fonctionnement en continu permet d'éviter les temps d'attente dans la chaîne de production et donc de limiter la croissance des micro-organismes. De plus, le fonctionnement

en continu permet une diminution de la durée de stérilisation car la température du produit entrant, si celui-ci a été emboîté à chaud, est plus haute que dans le cas d'une attente pour une stérilisation en discontinu. La stérilisation en continu permet également de garantir un cycle régulier et facilement maîtrisable et enfin, d'éviter les manutentions et les risques liés (Bazinet & Castaigne, 2011).

Les stérilisateur en continus peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- Les stérilisateur hydrostatiques

Le stérilisateur hydrostatique se présente sous la forme de deux colonnes d'eau (une entrée et une sortie) en forme de U qui permettent un maintien de la pression de la vapeur d'eau dans l'enceinte de stérilisation (Figure 19).

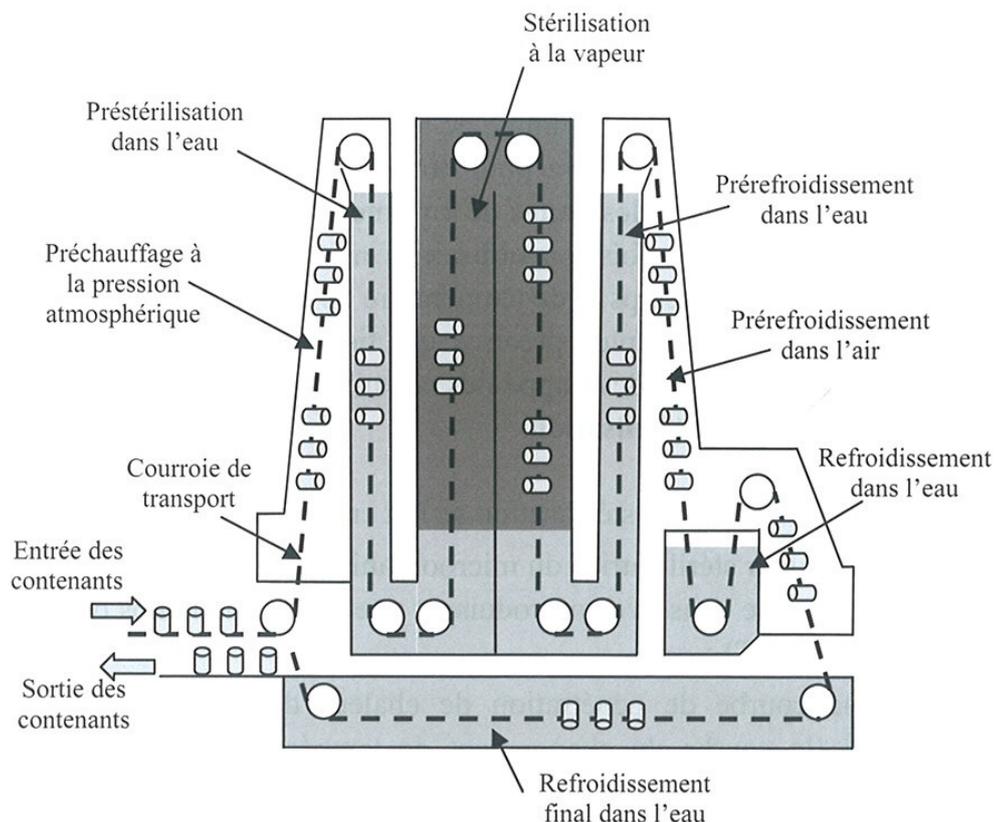


Figure 19 : Schéma d'un stérilisateur hydrostatique (d'après Bazinet & Castaigne, 2011).

Les deux colonnes correspondent à la zone de préchauffage et à la zone de refroidissement. La température palier de la stérilisation est fonction de la hauteur d'eau dans les colonnes. Le stérilisateur se présente sous forme de colonne ou de puits de 10 mètres pour une température

stérilisatrice de 120 °C et de 23 mètres pour une température stérilisatrice de 130°C. Les boîtes sont introduites par une chaîne transporteuse continue qui parcourt les trois colonnes de préchauffage, stérilisation et refroidissement. Les boîtes parcourent la chambre de stérilisation pendant une durée qui est réglée par la vitesse de circulation, qui tient compte du barème de stérilisation à appliquer (Bazinet & Castaigne, 2011).

Comme les autoclaves, les stérilisateur peuvent réaliser ou non une agitation des boîtes.

Dans les stérilisateur rotatifs, un tambour rotatif permet, en même temps, la progression des boîtes et l'agitation du produit par frottement des boîtes sur la paroi du cylindre et par gravité. L'agitation permet une pénétration de la chaleur plus rapide. Cette convection forcée permet de stériliser les produits avec des températures plus hautes qu'avec un autoclave statique, jusqu'à environ 135 °C. Un deuxième cylindre est couplé pour le refroidissement en continu à pression atmosphérique ou avec une surpression d'air (Bazinet & Castaigne, 2011).

- L'*hydrolock*, l'*Hydroflow* et le *stériflamme* sont des appareils statiques de stérilisation et de refroidissement en continu ou l'agitation du produit s'effectue par la rotation des contenants eux-mêmes. Ce qui différencie ces trois types d'appareil est la source de chaleur (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.3 *Le blanchiment*

Le blanchiment est un prétraitement qui consiste à chauffer brièvement les légumes ou certains fruits à une température comprise entre 85 et 100 °C, puis à les refroidir avant de leur faire subir d'autres types de traitements tels que la stérilisation ou bien la surgélation.

4.3.1 *Objectifs du blanchiment*

Le blanchiment a un objectif principal qui est l'inactivation enzymatique, du tissu végétal mais aussi des enzymes microbiennes.

Les enzymes du tissu végétal telles que la catalase et la peroxydase peuvent provoquer des altérations de la couleur et de l'arôme par oxydation. Des enzymes hydrolytiques peuvent conduire à la formation d'odeurs et de saveurs indésirables. Les lipases sont à l'origine de la formation d'acides gras libres qui vont amener un goût rance ; les protéases vont amener à la

formation de peptides amers, enfin les amylases à la formation de sucres simples. Enfin le produit peut être altéré d'un point de vue de la couleur par différentes enzymes telles que les polyphénols oxydases qui entraînent un brunissement enzymatique, les chlorophyllases qui détruisent les chlorophylles des légumes verts et enfin les lipoxydases qui détruisent le carotène.

La catalase et la peroxydase sont les deux enzymes les plus résistantes aux traitements thermiques c'est pourquoi l'efficacité du blanchiment est déterminé par la mesure d'activité résiduelle de ces deux dernières enzymes.

Le blanchiment a aussi comme objectifs de diminuer le nombre de microorganismes à la surface des légumes, de modifier la structure cellulaire du tissu végétal afin de faciliter le remplissage des boîtes, de rendre la couleur des légumes verts et des carottes plus attrayante, d'éliminer l'air et le gaz intracellulaire, de lessiver les nitrites, nitrates, et oxalates solubles ainsi que les résidus de pesticides (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.3.2 Différents types de blancheur

Le blanchiment peut se faire par immersion des produits dans l'eau chaude ou par passage de vapeur d'eau. Les blancheurs à eau sont les plus simples et les plus répandus dans l'industrie alimentaire. Bien qu'ils soient faciles d'utilisation, ils présentent l'inconvénient majeur de générer des effluents volumineux, dommageables pour l'environnement. Les blancheurs à vapeur sont nettement moins polluants, car les composés solubles du produit alimentaire ne sont pas extraits par lessivage. De plus, le volume d'effluents est cinq fois moindre. En contrepartie, l'efficacité énergétique des blancheurs à eau est nettement supérieure (50 à 60 %) à celle des blancheurs à vapeur (entre 10 et 20 %) (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.3.2.1 Blancheur à eau

Le blancheur à eau est constitué d'un cylindre (environ 4 m de long) placé horizontalement. A l'intérieur de ce cylindre est placé un deuxième cylindre coaxial, perforé qui va permettre l'avancement des légumes le long du blancheur de l'entrée à la sortie. Le temps de séjour des légumes dans le blancheur est réglé par la vitesse de rotation du cylindre coaxial. Un système de refroidissement peut être disposé à la sortie du blancheur afin de refroidir le produit, notamment dans les chaînes de fabrication de produits surgelés (Bazinet & Castaigne, 2011).

4.3.2.2 *Blancheur à la vapeur*

Le blanchiment à la vapeur permet un chauffage plus rapide des aliments que le blanchement à l'eau. Les blanchiments à vapeur de type IQB (Individual Quick Blanching) permettent un traitement homogène des produits. Lorsque ce système est associé à un refroidissement à air forcé humide (pour éviter la dessiccation), la production d'effluents est considérablement réduite. Le défaut d'un tel système reste néanmoins la perte considérable en eau du produit (Bazinet & Castaigne, 2011).

5. Impact des conditions physico-chimiques, des procédés industriels ou domestiques, sur les folates

5.1 Impact des conditions physico-chimiques sur la dégradation des folates en solution modèle

La dégradation de l'acide folique et de ses dérivés par oxydation est assez bien documentée dans la littérature mais avec des résultats relativement contradictoires.

5.1.1 Impact de l'oxygène sur la dégradation des folates

Chen & Cooper (1979) ont étudié la stabilité du H₄folate et du 5-CH₃-H₄folate (Tableau 11). La concentration des deux dérivés a été déterminée par dosage microbiologique utilisant la bactérie *L. casei*. La présence d'oxygène augmente la dégradation à la fois du H₄folate et du 5-CH₃-H₄folate lors des traitements thermiques à 100 °C. Les expériences ont été menées avec une concentration en oxygène atmosphérique ou bien par barbotage d'azote continu dans la solution pendant la durée de l'expérience. Le 5-CH₃-H₄folate suit une cinétique d'ordre 1 dans la gamme de température comprise entre 65 et 100 °C, avec une énergie d'activation de 9,5 Kcal/mol. Les résultats concernant la dégradation thermique du H₄folate sont variables avec un taux de dégradation plus faible à 100 °C qu'à 80 °C, 65 °C ou 50 °C, c'est pourquoi l'énergie d'activation pour le H₄folate n'a pas pu être calculée.

La présence d'un flux d'azote dans les deux cas diminue significativement la vitesse de dégradation à 100 °C, d'où l'hypothèse que cette dégradation soit une oxydation. Le H₄folate apparaît être moins stable que le 5-CH₃-H₄folate. Par contre, aucune information n'est mentionnée quant au pH, l'ensemble des expériences ayant été conduite dans de l'eau déminéralisée. Enfin, à 100 °C l'oxygène gazeux a une solubilité nulle dans l'eau.

Ruddick *et al.* (1980) a lui aussi étudié l'impact de l'oxygène sur la cinétique de dégradation du 5-CH₃-H₄folate dans du tampon phosphate à pH 7,3 (Tableau 11). Les cinétiques de dégradation ont été menées dans une gamme de température comprise entre 40 et 100 °C avec des concentrations en oxygène de 6,3 ppm à 8 ppm. Une réaction de pseudo ordre 1 a été suggérée pour les dégradations thermiques en présence d'oxygène non limitant avec une énergie d'activation calculée à 7,1 kcal/mol.

Day & Gregory (1983) ont eu aussi déterminé que la cinétique de dégradation du 5-CH₃-H₄folate et de l'acide folique à pH 7, avec un apport limité en oxygène contrôlé par une électrode de Clark, mesurée après l'expérience à 25°C.

A des températures comprises entre 100 et 140 °C, ils ont identifié une cinétique d'ordre 2. Ils ont aussi étudié l'impact d'acide ascorbique et de fer sur la stabilité de l'acide folique et du 5-CH₃-H₄folate. L'acide folique présente une plus grande stabilité en présence de fer et la plus faible pour une solution sans fer ni acide ascorbique. Le même comportement est observé pour le 5-CH₃-H₄folate qui présente même une plus forte stabilité que celle observée pour l'acide folique. Ceci est en contradiction avec le reste de la littérature, les ions Fe²⁺ et Cu²⁺ ayant été identifié comme étant des catalyseurs de l'oxydation du H₄folate par l'oxygène de l'air. De plus l'oxydation en milieu anaérobie du H₄folate et des tétrahydroptérines en présence d'ion ferrique et cuivrique a été démontrée (Hawkes & Villota, 1989). Dans l'étude de Day & Gregory (1983) la stabilisation par le fer peut s'expliquer par leur dispositif expérimental limitant l'apport d'oxygène à la solution et donc limitant la dégradation oxydative de l'acide folique et du 5-CH₃-H₄folate (Hawkes & Villota, 1989). Day et Grégory (1983) ont d'ailleurs trouvé une stabilité des deux dérivés bien supérieure à celle déjà obtenue par Cooper *et al.* (1978), Chen & Cooper (1979), Paine-Wilson & Chen (1979) et Ruddick *et al.* (1980).

Barrett & Lund (1989) ont aussi étudié l'effet de l'oxygène sur la dégradation thermique du 5-CH₃-H₄folate. Ils suggèrent que les divergences observées dans les études antérieures seraient dues à des problèmes de diffusion de l'oxygène dans le milieu. Dans leur étude, ils ont éliminé l'oxygène à l'interface entre le liquide et le gaz pour limiter les transferts de masse de l'oxygène vers le milieu. Ils ont calculé des énergies d'activation supérieures à celles déjà reportées, de 68,13 kJ/mol (Tableau 11), pour les cinétiques de dégradation thermiques conduites en présence d'excès d'oxygène (avec un ratio molaire de 9,5 [O₂] : 1,0 [5-CH₃-H₄folate]) entre 40 °C et 92 °C, température maximale appliquée dans l'expérience.

L'énergie d'activation pour les cinétiques de dégradation thermique en absence d'oxygène est de 97,4 kJ/mol, pour une gamme de température comprise entre 40 et 92 °C.

Viberg *et al.* (1997) ont eux aussi étudié l'impact de l'oxygène sur la dégradation du 5-CH₃-H₄folate (Tableau 11), dans du tampon à pH 7, pour des Ultra Hautes Températures (110 à 150 °C). Dans cette étude, au contraire de Barrett & Lund (1989), les auteurs ont réalisé des cinétiques de dégradation en appliquant une pression sur le milieu afin de faciliter la dissolution de l'oxygène dans la solution lors des traitements à haute température. Les énergies d'activation obtenues étaient de 62 kJ/mol en absence d'oxygène et 106 kJ/mol en présence d'oxygène.

Les énergies d'activation calculées, dans l'étude de Mnkeni & Beveridge (1983) (82,8 kJ/mol) et de Barrett & Lund (1989) (97,4 kJ/mol) sont plus élevées mais similaires à celle de l'étude de Viberg *et al.* (1997).

Les énergies d'activation calculées varient donc entre 30 kJ/mol et 82,8 kJ/mol. Il semblerait qu'il y ait deux groupes de résultats, un dont les énergies d'activation sont de l'ordre de 30 kJ/mol (Chen & Cooper 1979 ; Ruddick *et al.* 1980) et un autre pour lequel les énergies d'activation sont de l'ordre de 80 kJ/mol (Barrett & Lund 1989 ; Mnkeni & Beveridge 1983). La différence entre ces deux groupes comme l'ont suggéré Viberg *et al.* (1997), pourrait s'expliquer par les différents mécanismes mis en jeu dans la dégradation thermique du 5-CH₃-H₄folate, soit chimique (Mnkeni & Beveridge, 1983) soit physique (Barrett & Lun, 1989).

Tableau 11 : Effet de l'oxygène sur la dégradation du 5-CH₃-H₄folate

Dérivé	Condition O ₂	pH	Gamme température	Méthode dosage	Ea (kJ/mol)	Références	
5-CH ₃ -H ₄ folate	nd	nd	49 - 100 °C	Microbiologique	39,74	Chen & Cooper, 1979	
	O ₂ non limitant	7,3	20 °C	Microbiologique	7,1	Ruddick <i>et al.</i> , 1980	
	O ₂ non limitant		3	100 - 121 °C	Microbiologique	79,50	Mnkenni <i>et al.</i> , 1983
			4			71,13	
			5	100 – 130 °C		82,42	
			6			82,84	
	O ₂ 5,3 ppm		3	100 – 130 °C		56,90	
			4			49,37	
			5	100 – 140 °C		55,23	
			6			55,65	
Excès O ₂ Excès N ₂		7	40 - 92 °C	HPLC	68,19	Barrett & Lund, 1989	
					97		
Présence O ₂ Absence O ₂		7	110 – 150 °C	HPLC	62	Viberg <i>et al.</i> , 1997	
					106		

Ces études montrent bien l'impact potentialisateur de l'oxygène lors de la dégradation thermique du 5-CH₃-H₄folate et de l'acide folique. Des différences sont observées pour les valeurs des énergies d'activation qui, somme toute, restent dans le même ordre de grandeur. Ces différences peuvent en partie s'expliquer par le dispositif mis en place dans ces études, notamment la dissolution de l'oxygène dans les solutions. La concentration en oxygène dans les solutions n'est d'ailleurs quasiment jamais mentionnée. L'oxygène impacte la dégradation des folates, mais des études ont montré l'effet protecteur de certains antioxydants tels que l'acide ascorbique ou le β-mercaptoéthanol (voir paragraphe 5.1.2).

5.1.2 Effet des antioxydants sur la stabilité des folates

Chen & Cooper (1979), ont montré que la présence de 0,1 % d'acide ascorbique dans la solution a un effet protecteur du 5-CH₃-H₄folate lors de traitement thermique à 100 °C. En présence d'acide ascorbique, la perte en 5-CH₃-H₄folate est de 20 % en 3 heures, perte qui augmente à 90 % en 65 minutes lorsque l'acide ascorbique est absent (Tableau 12). Ces résultats sont en accord avec ceux de O'Broin *et al.* (1975) qui avait montré que 0,2 % d'acide ascorbique dans du tampon phosphate à pH 6,1 stabilise le 5-CH₃-H₄folate lors d'un cycle classique d'autoclave (121 °C pendant 12 à 15 minutes) (Tableau 12). L'étude plus récente de Xioawei Ng *et al.* (2008) obtient des résultats similaires sur la dégradation du 5-CH₃-H₄folate mono et triglutamate. Les temps de demi-vie pour ces deux composés étaient de 1183 min et 538 min à pH 3,5 en présence de 50.10⁻³ mol.l⁻¹ d'acide ascorbique pour le 5-CH₃-H₄folate mono et triglutamate respectivement. En absence d'acide ascorbique, le temps de demi-vie diminue pour les deux composés à 682 minutes et 212 minutes respectivement (Tableau 12). Les deux formes glutamylées ont un comportement similaire à pH 7, même si elles semblent moins stables qu'à pH 3,5. Les temps de demi-vie déterminés à pH 7 sont de 426 minutes et 241 minutes pour le 5-CH₃-H₄folate monoglutamate et triglutamate en présence d'acide ascorbique, temps qui diminuent à 133 minutes et 83 minutes respectivement en absence d'acide ascorbique. Le β-mercaptoéthanol montre lui aussi des effets protecteurs lors des traitements thermiques des folates. O'Broin *et al.* (1975) a montré en présence de β-mercaptoéthanol à 0,4 mol.l⁻¹ une perte de 10 % après 10 heures à température ambiante alors qu'en absence de β-mercaptoéthanol, la perte de 10 % est atteinte après 10 minutes (Tableau 12). Indrawati *et al.* (2004) ont observé les mêmes tendances. En absence de β-mercaptoéthanol, la constante de vitesse de dégradation *k* du

(6S)5-CH₃-H₄folate à 50 °C est de $17,97.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ et diminue fortement à $3,95.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ en présence de β -mercaptoéthanol (Tableau 12).

Tableau 12 : Paramètres cinétiques de dégradation des folates : effet des antioxydants

Dérivé	Antioxydant	Méthode dosage	Température	Temps	% Perte	k (x10 ⁻³ min ⁻¹)	t1/2 (min)	Référence
H ₄ PteGlu 5 ng.ml ⁻¹	β-mercaptoéthanol	Microbiologique <i>L. Casei</i>	ambiante	10 h	10			O'Broin <i>et al.</i> , 1975
			ambiante	10 h	10			
			ambiante	10 h	10			
			ambiante	10 h	10			
			ambiante	10 h	10			
			ambiante	11 h	50			
			ambiante	6 h	50			
			ambiante	4,1 h	90			
			ambiante	4,1 h	90			
H ₄ PteGlu 5 ng.ml ⁻¹	Acide ascorbique	Microbiologique <i>L. Casei</i>	121°C	15 min	33			
			121°C	15 min	61			
			121°C	15 min	54			
			121°C	15 min	84			
			121°C	15 min	100			
			121°C	15 min	100			
			121°C	15 min	100			
5-CH ₃ -H ₄ folate	Acide ascorbique	Microbiologique <i>L. Casei</i>	100°C	3h	20 %			Chen <i>et al.</i> , 1979
			100 °C	1 h	90 %			

[6S] 5-CH ₃ -H ₄ folate	β-mercaptoéthanol 2 %	HPLC	50 °C	3,95	Indrawati <i>et al.</i> , 2004
			70 °C	31,40	
			90 °C	89,85	
	β-mercaptoéthanol 0 %		50 °C	17,97	
5-CH ₃ -H ₄ folate Glu 1	Acide ascorbique pH 3,5	HPLC	nd		Xiaowei Ng <i>et al.</i> , 2008
				50.10 ⁻³ mol.l ⁻¹	
	0 mol.l ⁻¹		682		
	Acide ascorbique pH 7		nd		
50.10 ⁻³ mol.l ⁻¹	426				
	0 mol.l ⁻¹		133		
5-CH ₃ -H ₄ folate Glu 3	Acide ascorbique pH 3,5		nd		
				50.10 ⁻³ mol.l ⁻¹	
	0 mol.l ⁻¹		212		
	Acide ascorbique pH 7		nd		
50.10 ⁻³ mol.l ⁻¹	241				
	0 mol.l ⁻¹		83		

5.1.3 Effet du pH sur la dégradation des folates

Différents auteurs ont montré l'impact du pH lors de la dégradation thermique des différents dérivés de folates (Tableau 13).

Paine-Wilson & Chen (1979) ont étudié l'effet du pH (de 1,1 à 12) lors de cinétiques de dégradation à 100 °C de l'acide folique, du H₄folate, du 5-CH₃-H₄folate et du 5-HCO-H₄folate. La dégradation pour les quatre composés suit une cinétique d'ordre 1. Dans les mêmes conditions de traitements thermiques (même pH et même température), l'acide folique ainsi que le 5-HCO-H₄folate sont relativement stables avec des temps de demi-vie de l'ordre de l'heure tandis que le 5-CH₃-H₄folate et le H₄folate sont plus rapidement dégradés avec des temps de demi-vie de l'ordre de quelques minutes. Le pH a une large influence sur la stabilité des composés, l'acide folique et le 5-HCO-H₄folate sont stables après 10 heures de traitements thermiques dans une gamme de pH de 4 à 12. Par contre, leur dégradation augmente rapidement lorsque le pH est inférieur à 4. Le 5-CH₃-H₄folate montre une bonne stabilité à pH 7, qui diminue lorsque le pH augmente ou lorsque le milieu s'acidifie. Enfin, la stabilité du H₄folate à 100 °C diminue en fonction de la concentration en ion hydrogène dans une gamme de pH de 4 à 12. Paine Wilson (1979) a déterminé la dégradation du 5-CH₃-H₄folate et du H₄folate à pH 3 dans quatre tampons différents (tampon universel ; tampon HCl/KCl ; citrate/phosphate et citrate), la stabilité est influencée par la nature même du tampon où le tampon « universel » induit une plus forte dégradation du 5-CH₃-H₄folate que du H₄folate. Cependant, ceci pourrait s'expliquer par la méthode de dosage microbiologique qui a été utilisé, la croissance de la souche étant modifiée par le tampon universel lui-même (Hawkes & Villota, 1989).

O'Broin (1975) a lui aussi étudié l'impact du pH, entre 1 et 10, sur la stabilité du H₄folate, du 5-CH₃-H₄folate, du 5-HCO-H₄folate, du 10-HCO-H₄folate, du 5,10-CH⁺-H₄folate et de l'acide folique, à température ambiante. L'acide folique apparaît être moins stable à pH 6 avec un temps de demi-vie de 10 minutes, alors qu'à pH 9 et à pH 1, les temps de demi-vie sont de 65 et 50 minutes respectivement. Le 5-CH₃-H₄folate est le plus stable à pH 9 avec un temps de demi-vie de 329 minutes, à pH acide, entre 1 et 5, les temps de demi-vie sont de 25 et 50 minutes respectivement. Le 5-CH₃-H₄folate est stable à pH 9 dans du tampon Tris/HCl, ce qui est en contradiction avec les résultats de Paine-Wilson & Chen (1979). Hawkes & Villota (1989) ont émis l'hypothèse que la stabilité à pH 9 du 5-CH₃-H₄folate serait plus due à la nature du tampon qu'au pH proprement dit. Le 5-HCO-H₄folate montre une stabilité plus faible à pH acide qu'à pH basique avec des temps de demi-vie de 23 à 29 jours pour les pH 4

et 6 et 28 à 32 jours pour les pH de 8 et 10 (O'Broin *et al.*, 1975). Ces données sont cohérentes avec celles obtenues par Nguyen *et al.* (2006) qui a étudié la dégradation thermique couplée à la pression du 5-HCO-H₄folate. Le 5-HCO-H₄folate est plus stable à pH 9,2 avec une énergie d'activation de 47,18 kJ/mol qu'à pH acide pour lequel l'énergie d'activation est de 64,17 kJ/mol. Paine-Wilson & Chen (1979) ont aussi étudié la cinétique de dégradation thermique du 5-HCO-H₄folate à 100 °C et déterminé des temps de demi-vie du composé de 58 minutes à pH 1,1 dans du tampon HCl/KCl et de 1390 minutes à pH 12 dans du tampon universel. La stabilité du 5-HCO-H₄folate est plus élevée à pH 12 qu'à pH 1,1, ceci en accord avec l'étude de O'Broin *et al.* (1975). La différence entre les temps de demi-vie des deux études : 32 jours à pH 1 pour O'Broin *et al.* (1975) et 4160 minutes à pH 1,1 pour Paine-Wilson & Chen (1979) s'explique simplement par le fait que l'étude de O'Broin *et al.* (1975) a été menée à température ambiante et celle de Paine-Wilson & Chen (1979) à 100 °C. Néanmoins la même tendance est observée dans les deux études. Les études de O'Broin *et al.* (1975) et de Nguyen *et al.* (2006) ont les mêmes conclusions, cependant il reste difficile de les comparer du fait de la différence dans l'expression des résultats, l'un utilisant les temps de demi-vie l'autre la constante de dégradation k.

Le 5,10-CH⁺-H₄folate, montre une très bonne stabilité à pH acide, ceci résultant de la présence d'une cyclisation entre l'azote 5 et l'azote 10. O'Broin *et al.* (1975) a été le seul à étudier la stabilité du 5,10-CH⁺-H₄folate en fonction du pH. A température ambiante, les temps de demi-vie du dérivé sont de 14 à 17 jours pour des pH de 1 à 3.

Le 5,10-CH₂-H₄folate et le 10-HCO- H₄folate sont convertis en H₄folate et 5,10-CH⁺-H₄folate en milieu acide. Entre les pH 4 et 8, le 5,10-CH⁺-H₄folate peut être converti en 5-HCO-H₄folate pendant un traitement thermique. Le 5-HCO-H₄folate n'est pas stable en milieu acide et lors de traitement thermique à 100 °C, il peut être converti à son tour en 5,10-CH⁺-H₄folate. Le 5,10-CH⁺-H₄folate est relativement stable en milieu acide lors de traitement thermique. La stabilité du H₄folate, du H₂folate, du 5,10-CH₂-H₄folate, du 10-HCO-PteGlu et du 10-HCO- H₄folate semble être meilleure en milieu alcalin (Figure 19) (De Brouwer *et al.*, 2007), ceci étant en adéquation avec les résultats précédents de O'Broin *et al.* (1975) et Paine-Wilson & Chen (1979).

Tableau 13 : Effet du pH sur la stabilité des dérivés de folates

Dérivés	pH												θ (°C)	Méthode dosage	Référence
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
5-CH ₃ -H ₄ folate	1500	1680	2340	1680	3000	5460	7140	15000	19740	15900			ambiante	<i>L. casei</i>	O'Broin <i>et al.</i> , 1975
	1260					2100	5880	13800		5220					
	t _{1/2} (min)	3,38	9,9	13,10 8,35 8,56 2,73	3,35	6,3	6,73	8,77	7,53	5,41	3,45	2,63	2,21	100°C	<i>L. casei</i>
k (min ⁻¹)	0,205	0,070	0,053 0,083 0,081 0,254	0,207	0,110	0,103	0,079	0,092	0,128	0,201	0,264	0,313	100°C	<i>L. casei</i>	Paine-Wilson & Chen, 1979
PteGlu	2400	4800	1440	3360	>42000	>42000	>42000	>42000	30000	>42000			ambiante	<i>L. casei</i>	O'Broin <i>et al.</i> , 1975
	3840					4080	5040	8160							
	t _{1/2} (min)	88	105	526 586 603 438	1340	4160	6930		5940	5200	2189	41581	3780	100°C	<i>L. casei</i>
k (x10 ⁻³ min ⁻¹)	7,83	6,62	1,32 1,18 1,15 1,58	0,52	0,17	0,10	0,10	0,12	0,13	0,32	0,02	0,18	100°C	<i>L. casei</i>	Paine-Wilson & Chen, 1979
H ₄ folate	50	65	42	28	16	10	22	30	65	20			ambiante	<i>L. casei</i>	O'Broin <i>et al.</i> , 1975
					28	10	20 21	30							
	6,13	6,24		1,22		3,35		4,78				16,50	100°C	<i>L. casei</i>	Paine-

																Chen, 1979
	k (min^{-1})	0,113	0,111		0,567		0,207		0,145			0,042	100°C	<i>L. casei</i>		Paine- Wilson & Chen, 1979
5-HCO- H ₄ folate	$t_{1/2}$ (j)				23	28	29 30	31 32	28 33	36	32 20		ambiante	<i>L. casei</i>		O'Broin <i>et al.</i> , 1975
	$t_{1/2}$ (min)	58	209	800 1260 586 1220						4620	4160	1540	1390	100°C	<i>L. casei</i>	Paine- Wilson & Chen, 1979
	k ($\times 10^{-3}$ min^{-1})	12,0	3,32	0,87 0,55 1,18 0,567	0,233	0,450	0,467	0,217	0,500	0,150	0,167	0,450	0,500	100°C	<i>L. casei</i>	Paine- Wilson & Chen, 1979

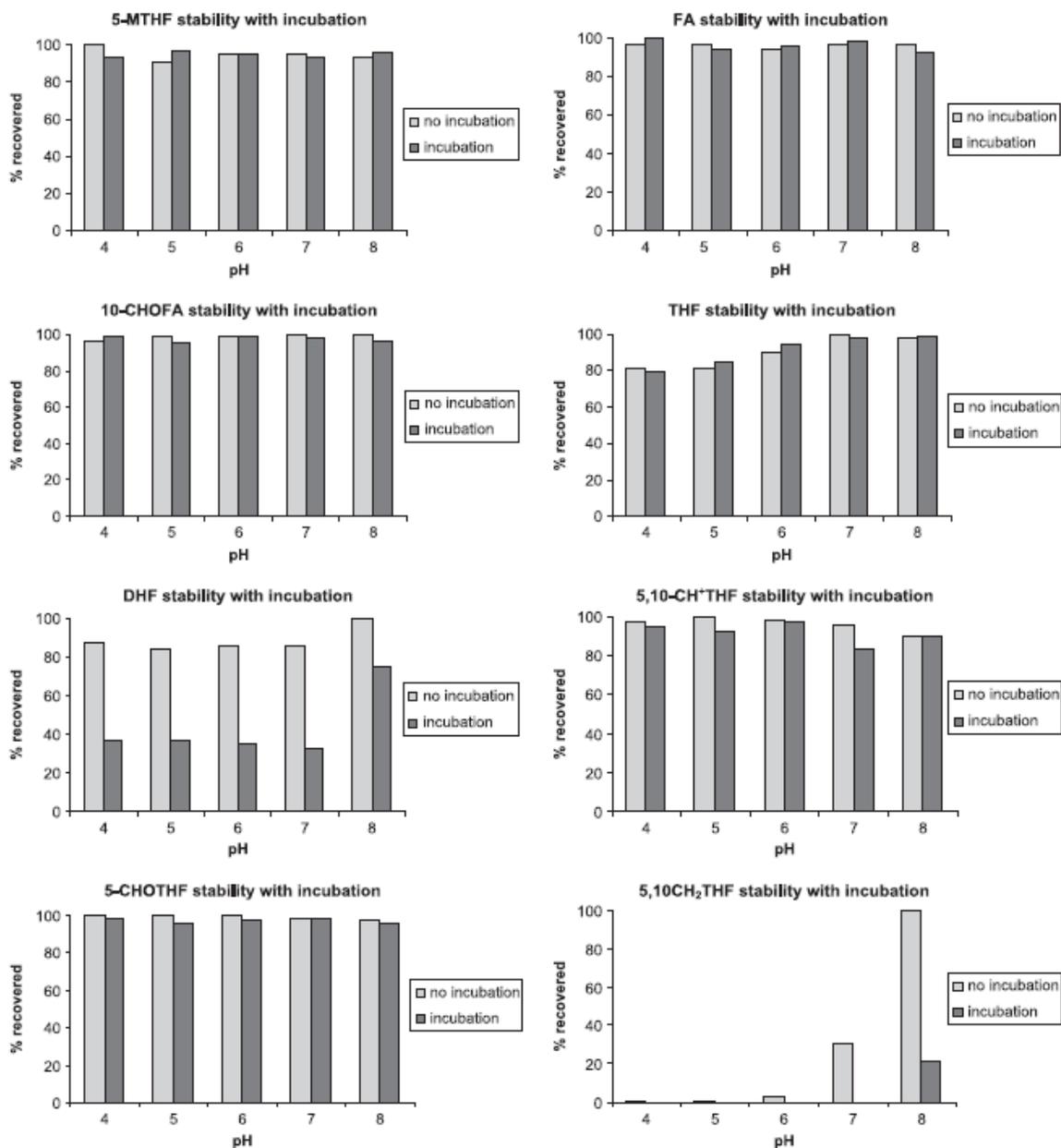


Figure 20 : Stabilité des différents dérivés en fonction du pH avec ou sans incubation à 37°C d'après De Brouwer *et al.*, 2007

5.1.4 Impact des traitements combinés pression-température sur la stabilité des folates

L'effet de traitement combiné température pression a été relativement bien étudiée sur le 5-HCO-H₄folate et sur le 5-CH₃-H₄folate, que ce soit l'énantiomère [6S] ou le mélange racémique [6RS] (Indrawati *et al.*, 2005 ; Nguyen *et al.*, 2006). Les cinétiques de dégradation en condition isobare et isotherme, pour le 5-HCO-H₄folate sont d'ordre 1 tout comme la cinétique de dégradation du 5-CH₃-H₄folate ([6S] ou [6RS]). Pendant un traitement

combinant pression et température, à pH 5, la concentration en 5-HCO-H₄folate diminue de 1,5 % de la concentration initiale, dans le cas d'un traitement à faible pression et faible température (P/T : 200 MPa / 50 °C) à 26 % de la concentration initiale dans le cas d'un traitement avec une pression plus forte et une température plus élevée (P/T : 800 MPa / 65 °C) (Nguyen *et al.*, 2006), pour un traitement de 25 minutes. La cinétique de dégradation lorsque le traitement thermique est combiné à un traitement de pression est comparable entre le [6S]5-CH₃-H₄folate et le [6RS]5-CH₃-H₄folate. La constante de vitesse k déterminée par Indrawati *et al.* (2005) est de 0,15 min⁻¹ à pH 7 et 90 °C pour le [6S]5-CH₃-H₄folate et de 0,18 min⁻¹ dans les mêmes conditions pour le [6RS]5-CH₃-H₄folate. Ces données sont en accord avec celle de Barrett & Lund (1989) qui a déterminé la constante k à 0,155 min⁻¹ à pH 7 à 92 °C, mais plus élevée que celle déterminée par Ruddick *et al.* (1980) de 0,077 min⁻¹ à 90 °C. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les expériences de Ruddick *et al.* (1980) ont été menées sans limitation de l'apport d'oxygène, qui a pu entraîner une plus forte dégradation du 5-CH₃-H₄folate que dans les expériences de Indrawati *et al.* (2005), qui ont été réalisées dans des tubes capillaires scellés.

5.1.5 Principales conclusions

La dégradation des différents dérivés et leur cinétique ont été relativement bien démontrées dans la littérature. L'ensemble des études s'accordent à dire que la cinétique de dégradation de l'acide folique et de ses dérivés suit une loi d'ordre 1. Il a été montré que l'oxygène catalyse la dégradation de tous les dérivés de folates. Cependant, même si les résultats suivent tous la même tendance, il reste difficile de comparer les données (notamment les temps de demi-vie, les constantes de dégradation). Ceci s'explique par la mauvaise maîtrise des apports en oxygène au cours des expériences. Dans la plupart des études, les solutions sont mises à barboter sous un flux d'azote mais aucun contrôle de l'oxygène n'est clairement établi et les concentrations en oxygène ne sont jamais suivies pendant les incubations.

Une stabilisation des folates par l'acide ascorbique ou le β-mercaptoéthanol a bien été démontrée. Le pH a un effet marqué et variable selon le vitamère considéré. L'acide folique, le 5-CH₃-H₄folate et le H₄folate sont stables à pH neutre, en revanche, le 5,10-CH₂-H₄folate est plus stable à pH 8, comme le H₂folate. Enfin, le 5,10-CH⁺-H₄folate est stable pour des pH compris entre 4 et 5.

La vitesse de dégradation augmente en fonction de l'augmentation de la température. Il en est de même lorsque les traitements thermiques sont combinés aux traitements hyperbars, un couple température / pression faible engendre moins de dégradation qu'un couple température / pression élevée.

5.2 *Impact des procédés de transformation sur les matrices végétales*

5.2.1 *Principaux résultats*

L'impact des procédés de transformation sur les matrices végétales, notamment les procédés thermiques tels que les cuissons (dans de l'eau à ébullition ou à la vapeur), le blanchiment, les micro-ondes, les hautes pressions, ont été relativement étudiées depuis la fin des années 70. La plupart de ces études ont été menées sur différents légumes tels que les choux de Bruxelles, les brocolis, les carottes, les tomates, les petits pois, les pois et pois chiche. Les épinards ont fait l'objet d'un certain nombre d'études, au contraire des haricots verts pour lesquels la bibliographie reste pauvre.

Malin (1977) a déterminé une faible perte après blanchiment de choux de Bruxelles, qu'il a attribué à la géométrie du légume, à un faible volume d'eau ainsi qu'à la concentration en acide ascorbique endogène. La stabilisation par l'acide ascorbique a été confirmée par Sotiriadis & Hoskins (1982) qui ont ajouté de la vitamine C dans des boîtes de conserve de tomate entraînant une meilleure stabilité des folates pendant le stockage.

Klein *et al.* (1979) ont déterminé les teneurs en folates dans des épinards et des haricots verts surgelés cuits de manière conventionnelle dans de l'eau à ébullition, pendant 10 minutes et 8 minutes respectivement. Pour ce faire, ils ont utilisé 280 g d'épinards et 250 g d'haricots verts pour 100 ml d'eau. Les épinards et les haricots verts ont aussi été cuits par micro-ondes pendant 8 minutes et 8,5 minutes respectivement. La teneur en folates a été déterminée par un dosage microbiologique à l'aide de deux souches bactériennes pour les épinards qui sont *S. faecalis* et *L. casei*, et une souche pour les haricots verts qui est *L. casei*. Les pourcentages de rétention des folates dans les matrices végétales pour les différents modes de cuisson (Tableau 14) sont de 85 % et 101 % pour les épinards et les haricots verts respectivement pour les cuissons conventionnelles et 95 % et 103 % pour les épinards et les haricots verts pour les cuissons aux microondes. Klein *et al.* (1979) en ont conclu qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux modes de cuissons, que les folates sont plutôt bien

retenus dans les matrices surgelées lors des cuissons lorsque les temps de cuisson sont courts et qu'un minimum d'eau est utilisé pour ces cuissons.

DeSouza & Eitenmiller (1986) ont étudié l'impact du blanchiment (dans de l'eau ou à la vapeur), de la surgélation et de la stérilisation (Tableau 14) Cette étude a été menée sur deux matrices végétales, les épinards et les brocolis. La concentration en folates a été déterminée par dosage microbiologique à l'aide de la bactérie *L. casei*. Cette étude a fourni des informations quantitatives sur la perte en folates dans les épinards et les brocolis au cours de différents traitements. Le blanchiment à la vapeur n'induit pas de pertes majeures en folates à la fois dans les épinards et les brocolis. Les épinards montrent des pertes en folates supérieures à celles des brocolis au cours du blanchiment, les auteurs attribuent cela à une surface de contact supérieure pour les épinards. Dans cette étude, les résultats montrent clairement le rôle du lessivage dans la perte en folates au cours du blanchiment (DeSouza & Eitenmiller, 1986)

Melse-Boonstra *et al.* (2002) ont étudié l'effet de différents traitements tels que le blanchiment, la cuisson à la vapeur sur trois matrices végétales qui sont le poireau, les choux fleurs et les haricots verts. 200 g de chaque légume ont été blanchis dans 10 litres d'eau pendant 5 minutes pour les poireaux, 8 minutes pour les choux fleurs et 6 minutes pour les haricots verts. La cuisson au cuit vapeur a été effectuée avec 200 g de chaque légume et 1 litre d'eau pendant 5 minutes pour les poireaux, 7 minutes pour les choux fleurs et 6 minutes pour les haricots verts. La concentration en folates dans les différents échantillons a été déterminée par HPLC avec une détection en fluorimétrie. Melse-Boonstra *et al.* (2002) ont montré que la perte en folates après blanchiment est de 28 % pour les poireaux, 10 % pour les choux fleur et 21 % pour les haricots verts. La perte en folates lors des cuissons au cuit vapeur est de 26 % pour les poireaux, 8 % pour les choux fleurs et 10 % pour les haricots verts (Tableau 14). Quand le légume est en contact direct avec l'eau, la perte des formes monoglutamates est plus élevée que celle des formes polyglutamates, dont la concentration baisse peu. La principale cause de perte en folates serait donc ici un lessivage des formes monoglutamates. Melse-Boonstra *et al.* (2002) ont aussi conduit une étude à l'échelle pilote, ces deux études différaient par le volume d'eau utilisé pour le blanchiment, 1 litre par kilogramme de légume à l'échelle pilote et 50 litres par kilogramme de légume dans l'étude classique. La perte est plus importante dans le poireau pour l'étude classique (utilisant 50 litres d'eau pour le blanchiment). Ceci conforte l'importance du lessivage dans les pertes de folates au cours du blanchiment.

Mckillop *et al.* (2002) ont aussi étudié l'impact du blanchiment sur les pertes en folates, 25 g d'épinards ou de brocolis qui ont été cuits dans 100 ml d'eau pendant 3,5 minutes pour les épinards et 10 minutes pour les brocolis, ou au cuit-vapeur pendant 15 minutes. Ils rapportent un pourcentage de perte en folates dans les épinards et les brocolis blanchis de 51 % et 56 % respectivement (Tableau 14), ce pourcentage de perte augmentant avec le temps de blanchiment. La perte en folates est fortement dépendante de la nature de la matrice végétale. La cuisson au cuit vapeur des épinards et des brocolis n'entraîne pas de perte en folates même après un temps de cuisson maximal de 15 minutes.

Stea *et al.* (2006) ont déterminé la teneur en folates après différents modes de préparation comme la cuisson dans de l'eau à ébullition, après cuisson à la vapeur, après blanchiment. Pour la cuisson dans de l'eau à ébullition, 50 g de brocolis ont été cuits dans 1 litre d'eau pendant 4 minutes. La cuisson à la vapeur a été réalisée dans un four à 100 °C pendant 5 minutes. Enfin, le blanchiment a été réalisé pendant 5 secondes avec le même rapport solide liquide que pour la cuisson dans de l'eau à ébullition. Le blanchiment et la cuisson au cuit vapeur induisent une augmentation significative de la concentration en folates relativement à la matière sèche, de 31 et 41 % respectivement, tandis que les concentrations exprimées en matière fraîche montrent une augmentation significative de 37 % pour la cuisson au cuit vapeur et aucun effet pour le blanchiment. La cuisson dans de l'eau à ébullition induit quant à elle une perte de 24 % de la teneur en folates par rapport à la matière fraîche (Tableau 14).

McKillopp *et al.* (2002), Melse-Boonstra *et al.* (2002) et Stea *et al.* (2006) ont étudié l'impact de la cuisson au cuit vapeur et comparé à un blanchiment ou une cuisson dans de l'eau à ébullition. Ils ont tous conclu que la cuisson au cuit vapeur n'implique pas de pertes en folates, la rétention des folates est nettement plus marquée après une cuisson au cuit vapeur qu'après une cuisson dans de l'eau à ébullition, ceci étant en accord avec les études précédentes de Desouza & Eitenmiller (1986).

De plus, d'autres méthodes de cuisson qui minimisent le contact de l'eau avec les légumes telles que la cuisson aux microondes et la cuisson par pression ont montré une meilleure rétention des folates que lorsque les légumes sont cuits avec un mode de cuisson qui les met en contact avec de l'eau (Leskova *et al.*, 2006). La perte en folates dans l'eau à ébullition, par lessivage dépend de la géométrie même du légume et est d'autant plus marquée que le rapport volume / surface est élevé (Holosava *et al.*, 2008). La rétention des folates est de plus de 75 % pour le brocolis, le chou de Bruxelles et le chou fleur alors que ce taux de rétention chute entre 37 et 52 % pour les épinards, la carotte et le chou de Savoie (Holosava *et al.*, 2008).

Paul & Southgate (1978) avaient montré que les légumes racines avaient un pourcentage de rétention de 50 % après cuisson alors que le taux de rétention des légumes feuilles était de 20 à 40%. La revue bibliographique de Leskova *et al.* (2006) mentionne aussi l'étude de Lin & Lin (1999) qui avaient observé que les légumes feuilles ont un pourcentage de rétention de 30 % alors que le pourcentage de rétention des folates est de 50 à 90 % pour les légumes non feuilles.

Tableau 14 : Impact de différents modes de cuisson sur la perte en folates dans les légumes

Légumes	Traitement	% Perte	% Rétention	Concentrations *(mg.kg ⁻¹)	Référence
Epinards	Cru			1.37 ± 0.25	Klein <i>et al.</i> , 1979
				1.66 ± 0.49	
	Cuit eau à ébullition		89	1.4 ± 0.37	
	280 g de légume		81	1.72 ± 0.14	
	100ml eau 10 min				
Epinards	Micro-ondes		105	1.75 ± 0.64	DeSouza <i>et al.</i> , 1986
	280 g de légume		85	1.78 ± 0.22	
	8 min				
Haricots verts	Cru			0.46 ± 0.06	
	Cuit eau à ébullition		101	0.52 ± 0.08	
	250 g de légume				
Epinards	100ml eau 9 min				
	micro-ondes		103	0.6 ± 0.08	
	250 g de légume				
	8,5 min				
	Cru			2,51 ± 0,52	
	Blanchiment		17	0,45 ± 0,18	
	4min 100°C				
	1kg / 7 litre eau				
	Blanchiment vapeur		58	1,46 ± 0,4	
4 min					
40 g / 100 ml					
Stérilisation		50	0,21 ± 0,03		
54 min 122 °C					
15-18 psi					
350 g / 60 ml eau					
Liquide Blanchiment			0,14 ± 0,08		
Liquide Blanchiment vapeur			0,010 ± 0,005		
Liquide bocal Stérilisation			0,34 ± 0,05		

Légumes	Traitement	% Perte	% Rétention	Concentrations * (mg.kg ⁻¹)	Référence
Epinards	Cru			1,91 ± 0,058	McKillop <i>et al.</i> , 2002
	Blanchiment 3,5 min 25 g / 100 ml eau			0,94 ± 0,13	
	Blanchiment 15 min 25 g / 100 ml eau		35		
	Cru			1,89 ± 0,09	
	Cuisson vapeur 3 min 25 g			2,18 ± 0,22	
Poireau	Cru			0,496 ± 0,044 5,8 ± 0,56	Melse Boonstra <i>et al.</i> , 2002
	Stockage 24h 4°C	15		4,91	
	Blanchiment 200 g / 10 litres eau 5 min	28		4,17	
	Cuisson vapeur 200 g / 1 litre eau 5 min	26		4,31	
	Haute pression 200 MPa 5 min	81		2,36	
Choux Fleur	Cru			0,535 ± 0,082 6,9 ± 1,1	
	Stockage 24h 4°C	25		5,19	
	Blanchiment 200 g / 10 litres eau 8 min	10		6,26	

Légumes	Traitement	% Perte	% Rétention	Concentrations *(mg.kg ⁻¹)	Référence
Haricots verts	Cuisson vapeur 200 g / 1 litre eau 7 min	8		6,40	Melse Boonstra <i>et al.</i> , 2002
	Haute pression 200 MPa 5 min	43		3,94	
	Cru			0,391 ± 0,051 5,26 ± 0,65	
	Stockage 24h 4°C	-7		5,60	
	Blanchiment 200 g / 10 litres eau 6 min	21		4,14	
	Cuisson vapeur 200 g / 1 litre eau 6 min	10		4,71	
	Haute pression 200 MPa 5 min	47		2,77	
Brocolis	Cru			1,15 8,66	Stea <i>et al.</i> , 2006
	Blanchiment 50 g / 1 litre eau 5 secondes			1,15 11,30	
	Cuisson eau ébullition 50 g / 1 litre eau 100°C 4 minutes			0,86 10,09	
	Cuisson vapeur 50 g / 1 litre eau 100°C 5 minutes			1,57 12,19	

5.2.2 Principales conclusions

La dégradation des folates dans les matrices végétales est peu documentée. La plupart des études ont été faites sur des traitements unitaires tels que la cuisson dans de l'eau à ébullition, la cuisson au cuit vapeur, le blanchiment, la cuisson aux microondes.

Les différentes matrices comme les épinards, les brocolis, les haricots verts, les poireaux, les choux fleurs présentent des pertes en folates de 20 à 60 % lors des traitements de blanchiment ou dans de l'eau à ébullition, alors que les cuissons au cuit vapeur ou aux micro-ondes n'induisent pas ou peu de perte en folates.

L'ensemble des études montrent l'impact des traitements thermiques (blanchiment ou dans de l'eau à ébullition) sur la dégradation de folates. Bien que la plupart des auteurs identifient ces pertes comme étant de la dégradation thermique, ceci est en contradiction avec les effets très différents selon que le légume est ou non en contact avec le liquide. Peu d'auteurs ont réalisé un bilan massique avec le dosage des folates dans les eaux de cuisson, même si l'hypothèse d'un phénomène de lessivage ou de diffusion des folates est émise (Scott *et al.*, 2000).

La perte en folates pendant la cuisson est le résultat de la combinaison de deux mécanismes qui sont la dégradation thermique et le lessivage des folates dans les liquides de cuisson ou les liquides de blanchiment. La perte en folates dépend de plusieurs paramètres tels que le temps de cuisson, le rapport entre le volume d'eau utilisé et la masse de légumes, la forme géométrique et la surface du légume en contact avec l'eau de cuisson et enfin le pH, la teneur en oxygène, la concentration en métal, le taux d'antioxydant endogène. La présence d'agent réducteur dans les matrices alimentaires comme l'acide ascorbique peut augmenter la rétention des folates durant les traitements thermiques alors que la présence de fer (Fe^{2+}) peut impliquer une diminution de la teneur des folates dans les aliments. Les folates sont assez stables dans les matrices alimentaires sèches en absence d'oxygène et de lumière. Les pertes les plus élevées sont rencontrées pendant les cuissons des légumes feuilles avec une perte supérieure à 60 % en général. Les légumes non feuilles présentent des pertes en folates plus faibles, tout comme les aliments d'origine animale comme le poisson avec une rétention de 70 à 100% (Leskova *et al.* 2006). Les modes de cuisson qui minimisent le contact direct de l'aliment avec l'eau tels que les cuissons à haute pression, ou par micro-ondes sont plus favorables que les cuissons dans de l'eau à ébullition.

Chapitre 2 :
Objectifs et démarche

Les folates sont des vitamines d'un grand intérêt nutritionnel présentant un intérêt majeur pour la santé. L'Homme ne possède pas l'ensemble des enzymes nécessaires à la biosynthèse des folates, il est donc dépendant de son alimentation pour couvrir ses besoins en folates. Les fruits et particulièrement les légumes verts sont de bonnes sources en folates, mais sont la plupart du temps consommés à partir de produit transformés tels que les produits surgelés, appertisés, ou plus généralement cuisinés. Il a clairement été montré que les folates sont sensibles à différents paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, l'oxygène, paramètres présents au cours de la transformation des fruits et légumes. De plus, plusieurs études ont montré l'impact de traitements unitaires, comme le blanchiment, la surgélation ou la stérilisation, sur la dégradation des folates. Mais, à ce jour aucune étude n'a été menée sur l'impact de la globalité d'une chaîne de transformation industrielle sur les folates. C'est pourquoi mon travail de thèse s'est intéressé au devenir des folates au cours de la transformation industrielle des végétaux verts, la surgélation et l'appertisation.

1. Impact des transformations

Le premier objectif de mon travail de thèse a donc été d'étudier l'impact de la globalité d'une chaîne de transformation industrielle sur les pertes en folate, afin de déterminer quelles étapes du procédé impactent le plus sur ces pertes. Ce travail a été possible grâce au partenariat mis en place dans le cadre du projet Ribenut avec un industriel, la société Bonduelle.

La chaîne de surgélation et la chaîne d'appertisation partagent des étapes communes telles que le blanchiment, le lavage et présentent des étapes propres comme la surgélation et la stérilisation. Ces deux chaînes et en particulier la chaîne d'appertisation des haricots verts présente une large gamme d'intensité dans les traitements thermiques, les couples temps / températures appliqués au cours du blanchiment sont différents de ceux appliqués lors de la stérilisation. De plus, le blanchiment au cours de la surgélation des épinards et de l'appertisation des haricots verts, applique des durées différentes permettant d'avoir un contraste entre les deux chaînes industrielles pour ce traitement. Ces deux chaînes industrielles, présentent des étapes où les légumes sont en contact étroit avec l'eau dans des proportions variables. Le mécanisme de lessivage étant une des hypothèses émises quant à la perte en folate, elles sont donc deux bons modèles afin de valider cette hypothèse. Dans ce but, des prélèvements d'échantillons ont été réalisés à l'entrée et à la sortie de chacune des

chaines industrielles, ainsi qu'aux étapes qui apparaissaient être critiques quant à la perte en folate, à savoir le lavage et le blanchiment.

Nous avons choisi de travailler avec deux matrices végétales, les épinards et les haricots verts. Les épinards et les haricots verts sont des légumes largement consommés à partir de produits surgelés ou appertisés. L'épinard est une feuille alors que le haricot vert est une gousse. Les différences d'un point de vue botanique, entre ces deux légumes, conduisent à des structures histologiques différentes. La forme géométrique différente entre les épinards et les haricots verts, un plan *versus* un cylindre, amène à des rapports surface-liquide différents au cours des procédés de transformation. Ces deux aspects, structure histologique et structure géométrique, permettent d'espérer un contraste dans les pertes en folates en fonction de la matrice végétale. Ces deux légumes ont été considérés comme deux bons modèles d'étude.

La plupart du temps, la consommation des légumes transformés industriellement se fait après une préparation domestique. Il a donc été important d'étudier les pertes en folates au cours de ces préparations secondaires, ceci afin de déterminer les pertes et donc les apports réels en folates procurés par ces produits aux consommateurs. Nous avons focalisé notre étude sur la cuisson à la vapeur et la cuisson dans de l'eau à ébullition, qui sont deux modes de préparations classiquement utilisés par les consommateurs. De plus ces deux traitements sont différents d'un point de vue de leurs intensités et des contacts avec l'eau, entre eux et par rapport aux traitements industriels.

Dans la littérature, deux principaux mécanismes sont présentés comme étant impliqués dans les pertes en folates au cours du procédé, le mécanisme de dégradation thermique et le mécanisme de lessivage. Cependant, peu d'études ont mesuré les folates présents dans les liquides de cuissons permettant de conforter cette dernière hypothèse. C'est pourquoi, dès lors qu'il a été possible de collecter les liquides en contact avec les légumes au cours des traitements, industriels ou domestiques, nous avons mesuré leurs teneurs en folates.

Le dosage des folates, mis en place au début de ma thèse, a été réalisé par un dosage total après dérivatisation de l'ensemble des dérivés en 5-CH₃-H₄folate. Ceci a été fait en partenariat avec Aérial (Strasbourg), partenaire du projet Ribenut, qui avait préalablement développé ce dosage en 2001 (Ndaw *et al.*, 2001). Cependant, afin d'étudier le comportement des différents vitamères au cours du procédé industriel, leurs concentrations ont été déterminées par dilution

d'isotope stable et une détection en LC-MS. Ceci a permis d'identifier les dérivés qui sont le plus affectés au cours du procédé industriel. Ce travail a été réalisé à l'Université Technologique de Munich, spécialiste européen du dosage des différents dérivés de folates.

Les résultats conjoints de ces deux études ont permis de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans les pertes en folates au cours des procédés de transformation industriels et domestiques. Au cours de ces procédés de transformations, la diffusion des folates est apparue être un des principaux mécanismes impliqués dans la perte en folate. La dégradation thermique a semblé être un mécanisme peu présent au cours des traitements.

2. Etude des mécanismes

Ces conclusions ont conduit au deuxième objectif de ma thèse qui était l'étude des mécanismes régissant les pertes en folates au cours de la transformation des végétaux.

Le mécanisme de diffusion a donc été étudié en développant un dispositif expérimental original au laboratoire. Les cinétiques de diffusion ont été modélisées pour déterminer les constantes de vitesse de diffusion : la constante de diffusivité.

Les études antérieures mettent en cause une dégradation chimique des folates par oxydation au cours des procédés. Or le suivi au cours des transformations ne nous a pas permis d'observer une dégradation marquée des folates. Par ailleurs, la plupart des études réalisées l'ont été sans contrôle spécifique de l'oxygène dans le milieu. C'est pourquoi il nous a paru utile de vérifier l'impact de la dégradation thermique mais surtout l'impact de l'oxygène au cours de la dégradation thermique des folates, qu'ils soient en solution modèle ou bien dans des purées de légumes. Dans cette étude, il a donc été primordial d'avoir un contrôle strict des paramètres physico-chimique, notamment l'oxygène. Ce travail a donc été réalisé au sein de l'UMR 1145 Génial à AgroParisTech qui a développé un réacteur instrumenté. L'intérêt du réacteur instrumenté était de pouvoir réaliser des cinétiques de dégradation thermique en contrôlant l'ensemble des paramètres physiques tels que la température, le pH, l'agitation et les teneurs en oxygène. Enfin, le réacteur instrumenté permettait de maîtriser la teneur en oxygène dans le milieu tout en le mesurant en continu, à l'aide d'une sonde à fluorescence. Sa limite était celle de la sonde à fluorescence qui ne permet de mesurer les concentrations en oxygène que jusqu'à 85 °C, c'est cette limite qui a déterminée le choix des plages de température étudiées.

Chapitre 3 :
Matériels et Méthodes

1. Produits chimiques

1.1 Tampons et réactifs

Le sodium phosphate monobasique monohydrate (CAS n° 10049-21-5), le sodium phosphate dibasique (CAS n° 7558-79-4), l'acide ascorbique (CAS n° 50-81-7), l'acide orthophosphorique (CAS n° 7664-38-2), l'ascorbate de sodium (CAS n° 134-03-2), le chlorure ferrique (CAS n° 7705-08-0), le 2,2-dipyridyl (CAS n° 366-18-7), le N-éthylmaléimide (CAS n° 128-53-0), le trizma base (CAS n° 77-86-1), le tris HCl (CAS n° 1185-53-1), le borohydrure de sodium (CAS n° 16940-66-2), l'acide acétique (CAS n° 9035-69-2), le formaldéhyde 37% (CAS n° 98615-67-9), l'azide de sodium (CAS n° 26628-22-8) et l'acide formique (CAS n° 64-18-6) ont été fournis par Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France.

L'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique hydraté (MES hydrate) (CAS n° 71119-23-8) et l'acide acétique (CAS n° 9035-69-2) ont été fournis par Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Allemagne.

Le 2-octanol (CAS n° 6169-06-8), l'acide chlorydrique 37 % (CAS n° 9004-54-0), l'acétate de sodium (CAS n° 6131-90-4), l'acide trichloroacétique (CAS n° 76-03-9), le carbonate de sodium (CAS n° 144-55-8), l'éthanolamine (CAS n° 141-43-5), l'ammoniac 30 % (CAS n° 1336-21-6), le méthanol (CAS n° 67-56-1) et le tert-méthyle-butyle-éther (CAS n° 1634-04-4) ont été fournis par Merck, Fontenay sous bois, France.

Le β -mercaptoéthanol (CAS n° 60-24-2), l'hexane (CAS n° 92112-69-1), le méthanol (CAS n° 67-56-1), l'acétate de sodium (CAS n° 6131-90-4) et l'acétonitrile (CAS n° 75-05-8) ont été fournis par Merck, Darmstadt, Allemagne.

L'hydroxyde de sodium (CAS n° 95077-05-7), l'acide trifluoroacétique (CAS n° 76-05-1) et l'acétate d'éthyle (CAS n° 9002-89-5) ont été fournis par VWR, Fontenay sous bois, France.

L'acide ascorbique (CAS n° 62624-30-0) a été fourni par VWR, Darmstadt, Allemagne.

Le DL-dithiotréitol (CAS n° 3483-12-3) a été fourni par Fluka, St Quentin Fallavier, France.

L'acétonitrile (CAS n° 75-05-8) et l'hexane (CAS n° 92112-69-1) ont été fournis par Fischer Scientific, Illkirch, France.

Le dichlorométhane (CAS n° 75-09-2) a été fourni par Carlo Erba, Peypin, France.

Le Gel Agarose Affigel 10 Gel a été fourni par Biorad, Marne la Coquette, France.

La Protéine de liaison des folates (Folate Binding Protein ; FBP), lot n° 2258804, a été fournie par Scripps Labs., San Diego CA, USA.

La déconjugase de pancréas de poulet (lot n° 05432) a été fournie par Patricell Ltd., London, Royaume-Uni pour les expériences menées à Avignon et Difco Labs., Detroit MI, USA pour les expériences menées à l'Université Technologique de Munich. Le sérum de rat a été fourni par Biozol, Eching, Allemagne.

1.2 Standards

Le 5-CH₃-H₄folate, le 5-HCO-H₄folate, le 10-HCO-PteGlu, le H₄folate et le PteGlu ont été achetés chez Schircks laboratories, Jona, Suisse.

Le 5-CH₃-H₄folate diglutamate a été obtenu par réduction du Ptéroyl- γ -diglutamate (Schircks laboratories, Jona, Suisse) comme décrit par Ndaw *et al.* (2001).

Le 5-CH₃-H₄folate pentaglutamate, hexaglutamate et heptaglutamate ont été obtenus par la réduction du Ptéroyl- γ -pentaglutamate, Ptéroyl- γ -hexaglutamate et Ptéroyl- γ -heptaglutamate (Schircks laboratories, Jona, Suisse), comme décrit par Ndaw *et al.* (2001).

Les standards deutérés : [²H₄]5-CH₃-H₄folate, [²H₄]5-HCO-H₄folate, [²H₄]10-HCO-PteGlu, [²H₄]H₄folate, [²H₄]PteGlu, ont été synthétisés par Freisleben comme décrit dans Freisleben *et al.* (2002).

La lutéine a été donnée par Sylvie Sérino (Unité Plante et Système de culture Horticole, INRA, Avignon), l'apocaroténal a été acheté chez Fluka, St Quentin Fallavier, France.

1.3 Kits enzymatiques utilisés pour le dosage des sucres et acides

1.3.1 Dosage des sucres

Le dosage des sucres a été réalisé par spectrophotométrie à l'aide de kits enzymatiques fournis par Biopharm, Darmstadt, Allemagne.

- Le kit pour le dosage du glucose (référence : 10.716.251) est composé de deux solutions A et B :

La solution A est composée de 7,2 g de poudre (Tampon triétanolamine pH 7,6 ; NADP (110 mg) ; ATP (260 mg) et de sulfate de magnésium) dissous dans 45 ml d'eau milliQ.

La solution B est une solution d'hexokinase (320 U) et de Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (160 U).

- Le kit pour le dosage du fructose (référence : 10.139.106) est composé de trois solutions A, B et C :

La solution A est composée de 5 g de poudre (Tampon triétanolamine pH 7,6 ; NADP (64 mg) ; ATP (160 mg) et de sulfate de magnésium) dissous dans 25 ml d'eau milliQ.

La solution B est une solution d'hexokinase (200 U) et de Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (100 U).

La solution C est une solution de Glucose-6-phosphate isomérase (490 U).

- Le kit pour le dosage du saccharose (référence : 10.716.251) est composé de deux solutions A et B :

La solution A est composée de 7,2 g de poudre (Tampon triétanolamine pH 7,6 ; NADP (110 mg) ; ATP (260 mg) et de sulfate de magnésium) dissous dans 45 ml d'eau milliQ.

La solution B est une solution d'hexokinase (320 U) et de Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (160 U).

1.3.2 Dosage des acides

Le dosage des acides a été réalisé par spectrophotométrie à l'aide de kits enzymatiques (Biopharm, Darmstadt, Allemagne).

- Le kit pour le dosage de l'acide citrique (référence : 10.139.076) est composé de deux solutions A et B :

La solution A est composé de 1,4 g de lyophilisat de tampon glycylglycine pH 7,8 ; de L-malate déshydrogénase (136 U), de L-lactate déshydrogénase (280 U) et de 5 mg de NADH dissous dans 12 ml d'eau milliQ.

La solution B est composée de citrate lyase 12 U dissoute dans 12 ml d'eau milliQ.

- Le kit pour le dosage de l'acide malique (référence : 10.139.068) est composé d'une solution A :

La solution A est composée de 6 ml d'acide L-glutamique (14.6 mg.ml^{-1}) et de tampon glycyglycine pH 10 ; 1,2 ml de β -NAD (35 mg.ml^{-1}) ; 75 μl de Glutamate oxaloacétate transaminase (160 U) ; 75 μl de L-malate déshydrogénase (2400 U) et 22 ml d'eau milliQ.

2. Matériel Végétal

2.1 Prélèvement du matériel végétal sur les chaînes industrielles.

2.1.1 Chaîne de surgélation des épinards.

Le prélèvement des épinards le long de la chaîne industrielle de surgélation a été réalisé en Octobre 2010 à l'usine Bonduelle de Péronne (Picardie). Trois lots indépendants d'épinards ont été suivis sur la chaîne de transformation. Chacun des trois lots correspond à un camion d'environ 25 tonnes. Les trois différents lots d'épinards étaient issus du même cultivar : *Spinacea oleracea* cv. Dolphin, mais provenaient de différents producteurs locaux. Pour chaque point de prélèvement, trois échantillons ont été prélevés indépendamment pour chaque lot.

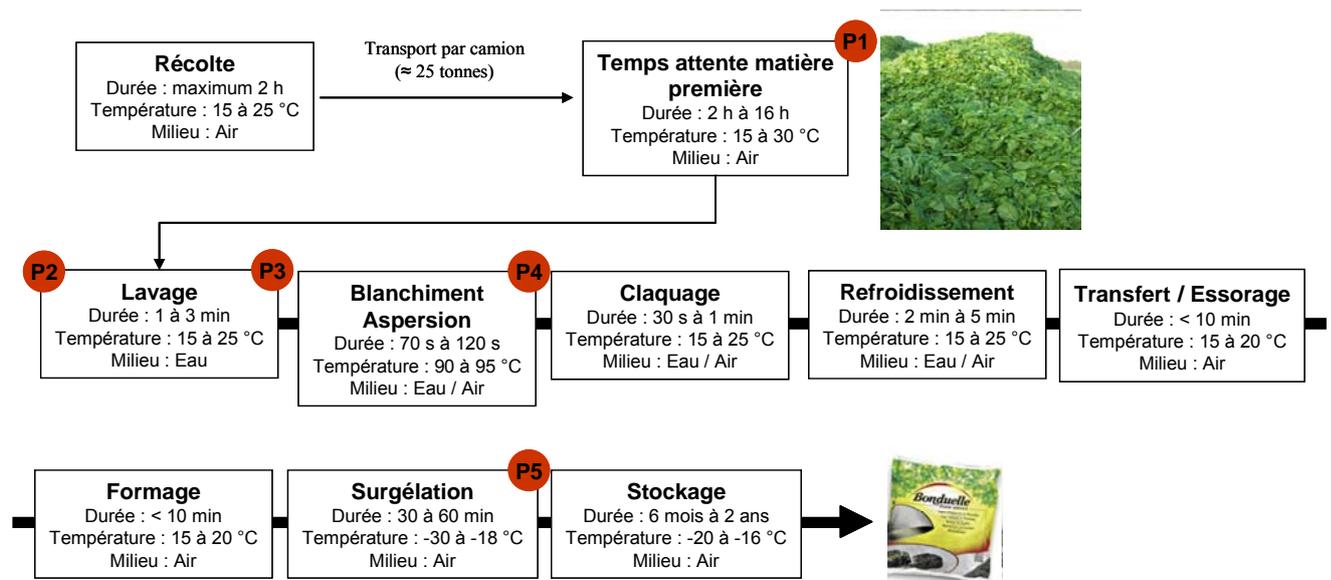


Figure 21: Représentation de la ligne de surgélation des épinards.

Les cercles rouges numérotés de P1 à P5 représentent les points de prélèvement des épinards.

P1 : « Matière première » ; P2 : « Avant lavage » ; P3 : « Après lavage » ; P4 : « Après blanchiment » ; P5 : « Produit fini ».

Le procédé de transformation, présenté Figure 21, débute par la récolte des épinards chez les différents producteurs locaux. Cette étape a une durée maximale de deux heures à température ambiante.

A leur arrivée à l'usine, les épinards n'ont pas été directement pris en charge sur la ligne de transformation, ils ont été mis en attente entre 2 et 16 heures avant le début de leur transformation, à une température d'environ 10 à 15 °C.

Lors de leur envoi en fabrication, les épinards ont été dans un premier temps lavés. Pour cela, ils ont été immergés dans un bain d'eau dont la température était comprise entre 15 et 25 °C. Le lavage a duré de 1 à 3 minutes.

Les épinards ont ensuite été blanchis par aspersion. L'étape de blanchiment a duré entre 70 et 120 secondes. La température de l'eau de blanchiment était comprise entre 90 et 95 °C.

Les épinards ont par la suite été claqués de 30 secondes à une minute puis refroidis par aspersion d'eau. La température de l'eau aspergée sur les épinards était comprise entre 15 et 25 °C, le temps de refroidissement était compris entre 2 et 5 minutes.

Les épinards ont ensuite été envoyés au formage, dont la durée pouvait aller jusqu'à 10 minutes. Cette étape permet la fabrication de palets d'épinards.

La dernière étape du procédé était la surgélation. La surgélation des palets d'épinards se fait à une température comprise entre -30 °C et -18 °C pendant 30 à 60 minutes.

A la fin, les palets d'épinards surgelés étaient stockés à -20 °C pour une durée maximale de deux ans.

Le prélèvement des échantillons (Figure 21) a été réalisé à cinq étapes clés de la chaîne de surgélation comme suit :

- A l'arrivée des épinards à l'usine, ces échantillons ont été nommés « Matière première » (P1) ;
- Avant et après l'étape de lavage, les échantillons ont été nommés « Avant lavage » (P2) et « Après lavage » (P3) ;
- Après l'étape de blanchiment, les échantillons ont été nommés « Après blanchiment » (P4);
- A la fin du procédé de transformation, après l'étape de surgélation ; les échantillons ont été nommés « Produit fini » (P5).

La matière première, les échantillons prélevés avant et après l'étape de lavage ainsi que les échantillons prélevés après le blanchiment ont été directement stabilisés par congélation à l'azote liquide. Les échantillons ont été temporairement stockés à -20 °C à l'usine puis envoyés au laboratoire par transport frigorifique dans de la carboglace. Au laboratoire, les échantillons ont été broyés à l'azote liquide (broyeur Retsch PM 400, Haan, Allemagne) et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Les échantillons « Produit fini » n'ont pas été stabilisés dans l'azote liquide à l'usine, ils ont été prélevés et envoyés au laboratoire par transport frigorifique dans de la carboglace pour être broyés à l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Les dates de prélèvement, le cultivar, le mode de lavage et de blanchiment ainsi que les heures de prélèvement aux différents points de la chaîne de surgélation sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15: Caractéristiques des trois lots d'épinards prélevés sur la chaîne de surgélation

Lot	Date de prélèvement	Cultivar	Mode de Blanchiment	Mode de lavage	Début récolte	Fin récolte	Arrivée usine	Prélèvement matière première	Prélèvement avant lavage	Prélèvement après lavage	Prélèvement après blanchiment	Prélèvement produit fini
A	12.10.10	Dolphin	Aspersion	Immersion	5h30	7h	8h17	10h15	14h15	14h30	14h40	15h
B	12.10.10	Dolphin	Aspersion	Immersion	3h30	5h	6h04	10h35	11h15	11h20	12h05	12h30
C	13.10.10	Dolphin	Aspersion	Immersion	16h15 (12.10)	18h (12.10)	19h09 (12.10)	9h20	9h30	9h30	9h35	10h

La codification utilisée pour les échantillons d'épinards prélevés le long de la chaîne de surgélation est présentée dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Codification des échantillons d'épinards prélevés sur la ligne de surgélation

Légume	Année et lieu prélèvement	Lot	Point prélèvement		Répétitions
EPI	BOND2010	Lot A	MP	<i>Matière première</i>	1-2-3
			AvLav	<i>Avant lavage</i>	1-2-3
			ApLav	<i>Après lavage</i>	1-2-3
			ApBlan	<i>Après blanchiment</i>	1-2-3
			ApSurg	<i>Après surgélation</i>	1-2-3
		Lot B	MP	<i>Matière première</i>	1-2-3
			ApLav	<i>Après lavage</i>	1-2-3
			ApBlan	<i>Après blanchiment</i>	1-2-3
			ApSurg	<i>Après surgélation</i>	1-2-3
		Lot C	AvLav	<i>Avant lavage</i>	1-2-3
			ApLav	<i>Après lavage</i>	1-2-3
			ApBlan	<i>Après blanchiment</i>	1-2-3
ApSurg	<i>Après surgélation</i>		1-2-3		

Les caractéristiques des lots A, B et C sont présentées dans le tableau 15.

2.1.2 Chaîne d'appertisation des haricots verts.

Le prélèvement des échantillons d'haricots verts le long de la ligne d'appertisation, présentée Figure 22, a été effectué en Août 2010 à l'usine Bonduelle de Renescure (Nord de la France).

Cinq lots différents de haricots verts, chacun issu d'un camion d'environ 20 tonnes, ont été prélevés le long de la chaîne de transformation. Quatre lots étaient issus du cultivar : *Phaseolus vulgaris* cv. Proton et un lot du cultivar *Phaseolus vulgaris* cv. Livorno, provenant de différents producteurs locaux. Trois échantillonnages ont été effectués pour chaque point de prélèvements pour chaque lot.

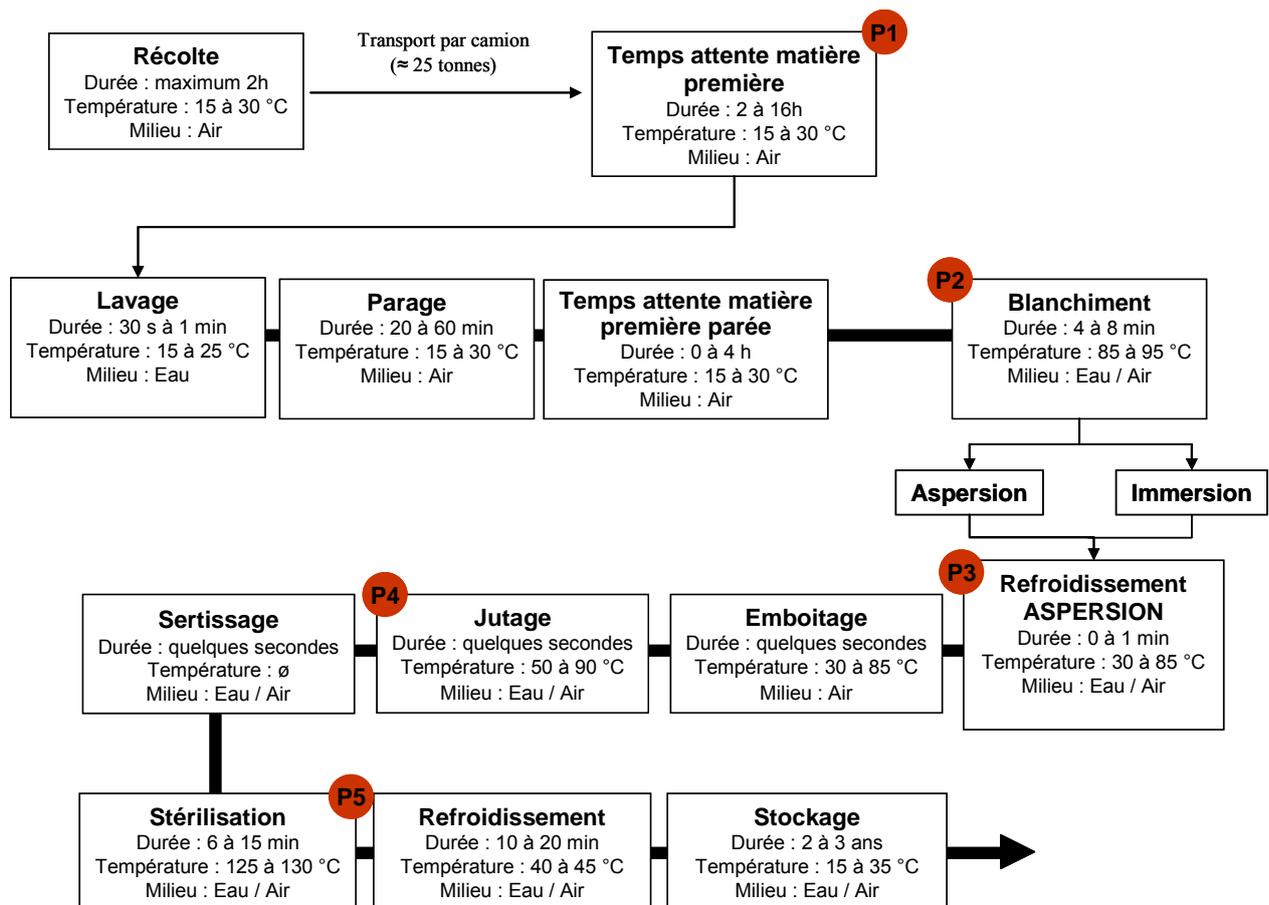


Figure 22 : Chaîne industrielle d'appertisation des haricots verts

Les cercles rouges numérotés de P1 à P5 représentent les points de prélèvement des haricots verts.

P1 : « Matière première » ; P2 : « Avant blanchiment » ; P3 : « Après blanchiment » ; P4 : « Avant jutage » ; P5 : « Produit fini ».

Les haricots verts après leur récolte (la récolte pouvant durer jusqu'à deux heures, à température ambiante) chez les différents producteurs locaux ont été mis en attente de 2 à 16 heures à une température d'environ 15 à 30 °C, avant d'être envoyés sur la ligne de transformation.

Les haricots verts ont dans un premier temps été lavés par immersion dans un bain d'eau dont la température était comprise entre 15 et 25 °C. La durée du lavage était de 30 secondes à 1 minute.

Les haricots verts ont ensuite été parés. Le parage consiste à couper les deux extrémités des haricots verts. Cette étape a une durée comprise entre 20 minutes et 1 heure. Les haricots verts parés ont été mis en attente pour une durée maximale de 4 heures avant d'être blanchis.

Le blanchiment des haricots verts sur la ligne d'appertisation peut se faire par deux types de blancheurs différents. Le premier blanchiment utilisé était un blanchiment par aspersion d'eau, le

deuxième type de blancheur était un blanchiment par immersion. Dans les deux cas, le temps de blanchiment ainsi que la température de l'eau de blanchiment étaient identiques, entre 4 et 8 minutes et entre 85 et 95 °C.

Les haricots verts ont ensuite été refroidis par aspersion d'eau pendant un temps maximal d'une minute. Le mode de refroidissement est le même que ce soit pour les haricots verts issus du blanchiment par immersion et par aspersion. La température de l'eau de refroidissement était d'environ 30 °C.

Les haricots ont été mis en boîte lors de l'étape d'emboitage et le jus de recouvrement a été ajouté lors de l'étape de jutage. Ces deux étapes durent quelques secondes chacune. Le jus de recouvrement était composé d'un mélange d'eau et de sel.

Les boîtes ont par la suite été serties et envoyées à la stérilisation.

Les conditions de stérilisation varient en fonction de la taille des boîtes. Le temps moyen de stérilisation pour l'ensemble des différentes boîtes était compris entre 6 et 15 minutes. La température de stérilisation était comprise entre 125 et 130 °C. A la fin de la stérilisation, les boîtes ont été refroidies pendant 10 à 20 minutes et stockées pour une durée maximale de 3 ans. La température de la zone de stockage varie entre 15 et 30 °C.

Les haricots verts ont été prélevés aux différentes étapes suivantes (Figure 22) :

- A l'arrivée des haricots verts à l'usine, les échantillons ont été nommés « Matière première » (P1) ;
- Avant et après le blanchiment, les échantillons ont été nommés « Avant blanchiment » (P2) et « Après blanchiment » (P3) ;
- Après l'ajout du jus de recouvrement, les échantillons ont été nommés « Après jutage » (P4) ; il est à noter que l'échantillonnage à cette étape n'a pu être réalisé que pour deux des cinq lots.
- A la fin du procédé de transformation, après la stérilisation, les échantillons ont été nommés « Produit fini » (P5).

Les échantillons (« Matière première » ; « Avant blanchiment » ; « Après blanchiment » ; « Avant jutage ») ont été directement stabilisés par congélation dans de l'azote liquide, stockés

temporairement à l'usine à -20 °C avant d'être envoyés par transport frigorifique dans de la carboglace au laboratoire où ils ont été broyés à l'azote liquide (broyeur Retsch PM 400, Haan, Allemagne) et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Les boîtes de conserves (« Produit fini ») ont été congelées directement à -20 °C, puis le liquide de recouvrement a été séparé des haricots verts par égouttage après décongélation. Les liquides de recouvrement ont été aliquotés et conservés à -80 °C. Les haricots verts ont été stabilisés et broyés à l'azote liquide (broyeur Retsch PM 400, Haan, Allemagne) et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Les informations complémentaires concernant les caractéristiques de production des différents lots prélevés sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Caractéristiques des échantillons de haricots verts prélevés sur la chaîne d'appertisation

Lot	Date	Cultivar	Mode de Blanchiment	Type de boîtes	Type haricots verts	Début récolte	Fin récolte	Arrivée usine	Prélèvement matière première	Prélèvement avant blanchiment	Prélèvement après blanchiment	Prélèvement produit fini
A	18.08.10	Proton	Aspersion	1/4	Coupés	2h50	4h15	5h01	10h50	14h10	14h10	14h10
B	18.08.10	Proton	Immersion	4/4	Non coupés	7h	9h35	10h50	11h20	14h45	14h45	14h45
C	18.08.10	Proton	Aspersion	1/4	Coupés	7h	9h35	10h50	11h20	16h30	16h30	16h30
D	19.08.10	Proton	Immersion	4/4	Coupés	1h20	3h25	4h09	9h30	-	-	-
E	18.08.10	Livorno	Immersion	1/2	Non coupés	16h50	18h30	19h58	-	11h45 (19.08.10)	-	-

La codification des échantillons de haricots verts prélevés le long de la ligne d'appertisation est présentée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Codification des échantillons de haricots verts prélevés sur la ligne d'appertisation

Légume	Année et lieu prélèvement	Lot	Points prélèvement		Nature haricot + taille boîte	Répétitions
HV	BOND2010	Lot A	MP	<i>Matière première</i>	coupés_1/4	1-2-3
			AvBlanAsp	<i>Avant Blanchiment par Aspersion</i>		1-2-3
			ApBlanAsp	<i>Après Blanchiment par Aspersion</i>		1-2-3
			AvJut	<i>Avant jutage</i>		1-2-3
			BteCons	<i>Produit fini dans boîte de conserve</i>		1-2-3
			BteCons_Jus	<i>Jus de recouvrement</i>		1-2-3
		Lot B	MP	<i>Matière première</i>	non coupés_4/4	1-2-3
			AvBlanIm	<i>Avant Blanchiment par Immersion</i>		1-2-3
			ApBlanIm	<i>Après Blanchiment par Immersion</i>		1-2-3
			BteCons	<i>Produit fini dans boîte de conserve</i>		1-2-3
			BteCons_Jus	<i>Jus de recouvrement</i>		1-2-3
			Lot C	MP		<i>Matière première</i>
		AvBlanAsp		<i>Avant Blanchiment par Aspersion</i>	1-2-3	
		ApBlanAsp		<i>Après Blanchiment par Aspersion</i>	1-2-3	
		AvJut		<i>Avant jutage</i>	1-2-3	
		BteCons		<i>Produit fini dans boîte de conserve</i>	1-2-3	
		BteCons_Jus		<i>Jus de recouvrement</i>	1-2-3	
		Lot D	MP	<i>Matière première</i>	coupés_4/4	1-2-3
			AvBlanIm	<i>Avant Blanchiment par Immersion</i>		1-2-3
			ApBlanIm	<i>Après Blanchiment par Immersion</i>		1-2-3
BteCons	<i>Produit fini dans boîte de conserve</i>		1-2-3			
BteCons_Jus	<i>Jus de recouvrement</i>		1-2-3			
Lot E	AvBlanIm		<i>Avant Blanchiment par Immersion</i>	non coupés_1/2		1-2-3
	ApBlanIm	<i>Après Blanchiment par Immersion</i>	1-2-3			
	BteCons	<i>Produit fini dans boîte de conserve</i>	1-2-3			
	BteCons_Jus	<i>Jus de recouvrement</i>	1-2-3			

Les caractéristiques des lots A, B, C, D et E sont présentées dans le Tableau 17.

2.2 *Cuissons domestiques.*

2.2.1 *Cuissons des épinards et des haricots verts frais*

Trois lots d'épinards (lots F, G et H) et d'haricots verts (lots O, P et Q) frais ont été achetés au supermarché (Auchan, Avignon) en Mars 2010 pour les lots F et O, et Janvier 2011 pour les lots G, H, P et Q. La moitié des trois lots d'épinards et d'haricots verts frais a été directement stabilisée par congélation dans de l'azote liquide. La moitié restante de chaque lot a été divisée en deux, un lot a subi une cuisson domestique dans de l'eau à ébullition, l'autre une cuisson au cuit vapeur.

2.2.1.1 *Cuissons dans l'eau à ébullition*

Les extrémités des branches d'épinards et les deux extrémités des haricots verts ont été coupées avant chaque cuisson. Les épinards et les haricots verts ont été immergés dans l'eau à ébullition pendant 8 minutes dans une cocotte en inox (modèle sitraforza, Sitram, France), non couverte à pression atmosphérique. Le temps de cuisson a été déterminé à l'aide d'un livre de recettes traditionnelles (Livre de recettes SEB, édition euro advertising/Esco/inco, Paris). Le rapport solide-liquide utilisé pour chaque cuisson était de 1 g pour 4 ml dans le cas des épinards et 1 g pour 2 ml dans le cas des haricots verts. A la fin de la cuisson, les légumes ont été égouttés à l'aide d'une écumoire, pesés et directement stabilisés par congélation à l'azote liquide. Les échantillons ont été broyés à l'azote liquide (broyeur Retsch PM 400, Haan, Allemagne) et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse. Les jus de cuisson ont été pesés et aliquotés avant d'être directement placés au congélateur à -80 °C, pour être conservés jusqu'à l'analyse.

2.2.1.2 *Cuissons au cuit vapeur*

La cuisson au cuit vapeur a été réalisée à l'aide d'un cuit vapeur SEB (SEB «cuit vapeur » série S07 ; SEB, Selongey, France).

Les épinards et les haricots verts ont été placés dans le cuit vapeur lorsque le réceptacle était rempli de vapeur d'eau. 200 g d'épinards et 300 g de haricots verts ont été cuits pendant 20 minutes. Les temps de cuisson ont été déterminés à l'aide d'un livre de recettes traditionnelles

(Livre de recettes SEB, édition euro advertising/Esco/inco, Paris). Le volume d'eau initial utilisé lors de la cuisson vapeur était de 1 litre pour les épinards et 500 ml pour les haricots verts. A la fin de la cuisson vapeur, les épinards et les haricots verts ont été égouttés à l'aide d'une écumoire, pesés et stabilisés par congélation à l'azote liquide. Les échantillons ont été broyés à l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

2.2.2 Cuisson des épinards et des haricots verts surgelés

Trois lots (lots I, J et K pour les épinards ; lots R, S et T pour les haricots verts), correspondant à trois sachets de légumes surgelés de la marque Auchan, ont été achetés au supermarché (Auchan, Avignon), en Mars 2010 pour les lots I et R, et en Janvier 2011 pour les lots J, K, S et T. Chaque lot a été divisé en deux. La première partie a été directement stabilisée par congélation à l'azote liquide, broyée à l'azote liquide et conservée à -80 °C jusqu'à l'analyse.

La deuxième moitié de chaque lot a été cuite par immersion dans de l'eau à ébullition.

Les épinards en branche surgelés et les haricots verts surgelés ont été immergés dans l'eau à ébullition, sans être préalablement décongelés, à pression atmosphérique, pendant 15 minutes pour les épinards et 13 minutes pour les haricots verts, dans une cocotte en inox (modèle sitraforza, Sitram, France), non couverte. Les temps de cuisson ont été déterminés à l'aide des recommandations inscrites sur les emballages. Le rapport solide liquide utilisé pour les cuissons était de 1 g pour 2 ml, pour les épinards et les haricots verts. A la fin de chaque cuisson, les épinards et les haricots verts ont été égouttés à l'aide d'une écumoire, pesés et directement stabilisés par congélation à l'azote liquide. Les échantillons ont été broyés à l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse. Les jus de cuisson ont été pesés et aliquotés avant d'être directement placés au congélateur à -80 °C, pour être conservés jusqu'à l'analyse.

2.2.3 Epinards et haricots verts en conserves

Trois lots d'épinards (lots L, M et N), de la marque Auchan et trois lots de haricots verts (lots U, V et W) de la marque Bonduelle en conserves, correspondant à une boîte de conserve de taille 4/4 (contenance de 850 ml) ont été achetés au supermarché (Auchan, Avignon) en Mars 2010 pour les lots L et U, et Janvier 2011 pour les lots M, N, V et W. Pour chaque lot, les

boîtes de conserve ont été ouvertes et les légumes ont été séparés du liquide de recouvrement par égouttage à l'aide d'une écumoire. Les légumes ainsi que le jus ont été pesés. Les légumes ont été stabilisés par congélation à l'azote liquide, broyés à l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse. Les jus de recouvrement ont été aliquotés avant d'être directement placés au congélateur à -80 °C, pour être conservés jusqu'à l'analyse.

3. Cinétiques de dégradation thermique

3.1 Dégradation thermique en présence d'oxygène atmosphérique (21%)

Les cinétiques de dégradation thermique en présence de 21 % d'oxygène ont été menées dans un becher plongé dans un bain marie. L'agitation était réalisée à l'aide d'un agitateur à hélices (VOS 16, VWR, Fontenay sous bois, France). Les cinétiques ont été réalisées à trois températures : 45, 65 et 85 °C chacune pour deux lots indépendants.

Les expériences ont été réalisées à partir d'épinards et de haricots verts en conserves achetés en grande surface en juillet 2012 (Auchan, Avignon). Les épinards provenaient de boîtes de conserves de marque Auchan (265 g poids net égoutté, contenance de 425 ml). Les haricots verts provenaient de boîtes de conserves de marque Bonduelle (220 g poids net égoutté contenance de 425 ml).

Les purées de légume ont été préparées comme suit :

Les boîtes de conserves ont été ouvertes et les légumes égouttés à l'aide d'une écumoire. 200 g d'épinards ou de haricots vert ont été prélevés et 400 ml d'eau milliQ ajoutés. Le mélange a été broyé pendant 1 minute à l'aide d'un ultraturax (modèle S25 18G, IKA, Staufen, Allemagne) à 13 000 rpm. Le pH de la purée a été mesuré. La purée d'épinard étant dense, il a été nécessaire de la diluer au 1/2 avec de l'eau milliQ, afin de faciliter l'agitation.

Les cinétiques ont été démarrées lorsque la purée était à la température souhaitée. Pour chaque points, 12 ml de purée ont été prélevés et directement placés à -80 °C.

Les cinétiques ont été enregistrées pendant 4 heures, avec des prélèvements à t 0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 150 ; 180 ; 210 et 240 minutes.

3.2 Dégradation thermique en présence de 40 % d'oxygène et en anoxie

Afin de suivre les cinétiques de dégradation thermique des folates en solution modèle ou dans des purées d'épinards et de haricots verts, j'ai utilisé le réacteur instrumenté développé par l'UMR 1146 GENIAL d'AgroParisTech à Massy, a pour objectif de suivre directement, à l'aide d'une sonde à absorbance et d'une sonde à fluorescence, la dégradation des vitamines (vitamine C et folates), soit en solution modèle soit dans les matrices végétales.

3.2.1 Dispositif expérimental.

Le réacteur instrumenté, présenté dans les Figures 23 et 24, est composé d'une enceinte thermostatée dans laquelle est placé le réacteur en verre, d'un diluteur de gaz, d'un système de mesure de l'oxygène.

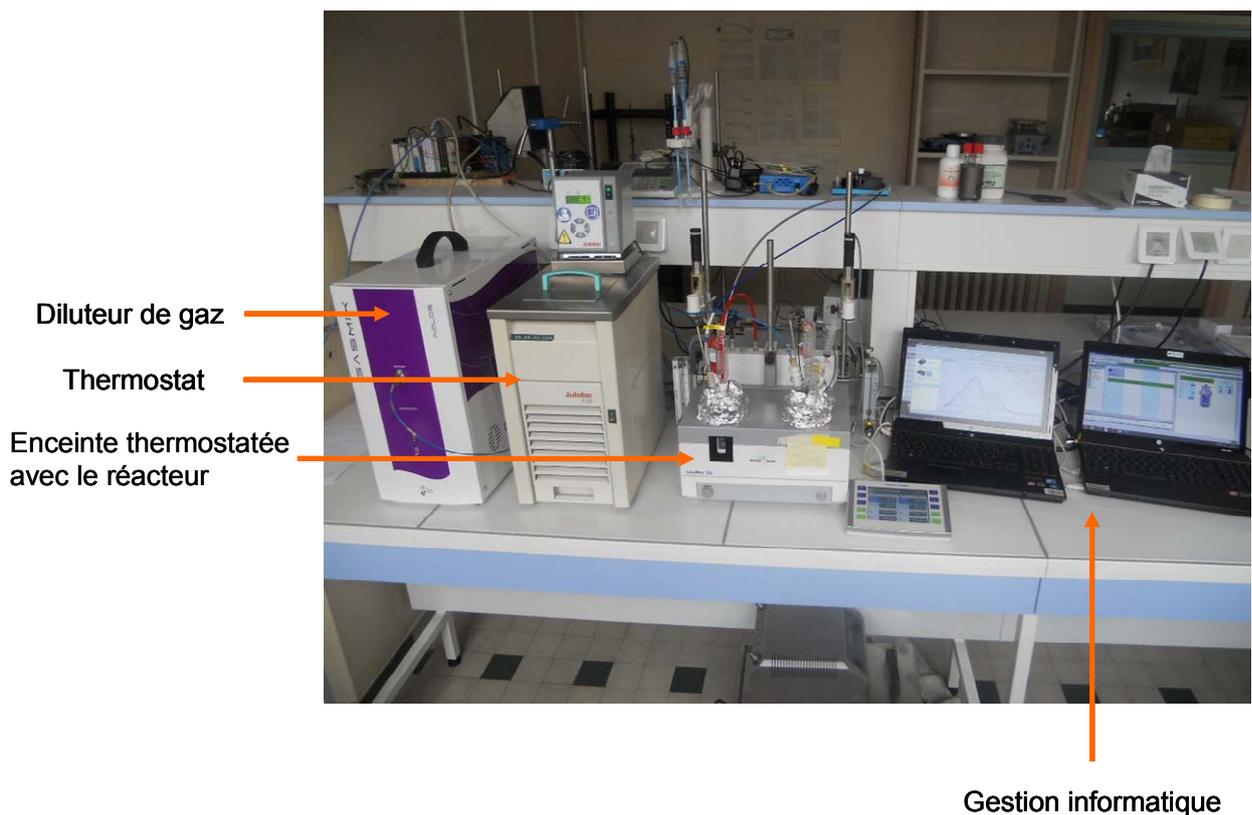


Figure 23: Le réacteur instrumenté et ses différents modules

Le fonctionnement de l'enceinte du réacteur (EasyMax, Mettler Toledo, Viroflay, France) est régi informatiquement. Les paramètres tels que la température et l'agitation sont

programmées en début d'expérience et sont constants tout au long de celle-ci. Dans cette enceinte est accueilli le réacteur en verre.

La température est régulée par un thermostat Julabo (F25-ED, Colmar, France) avec une plage de 6 à 12 °C, elle est régulée à l'aide d'une sonde à température (sonde à température du réacteur EasyMax, Mettler Toledo, Viroflay, France).

L'agitation est faite à l'aide d'un barreau aimanté en forme de croix d'une longueur de 4 cm.

Le réacteur en verre possède un bouchon présentant différentes ouvertures afin d'y introduire la sonde de température et le condenseur. Une autre ouverture est utilisée pour mettre en place le système de prélèvement, composé d'un capillaire lié hermétiquement à une seringue amovible de 10 ml. Deux autres sont utilisées pour introduire la sonde à absorbance et la sonde à fluorescence.

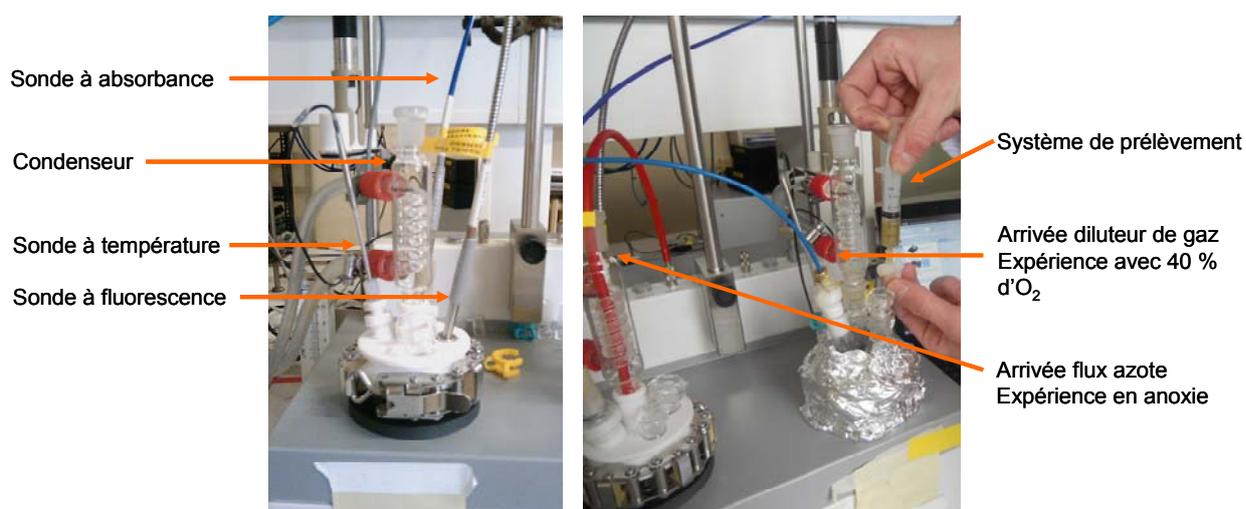


Figure 24: Le réacteur instrumenté, sondes à absorbance, fluorescence, système de prélèvement et diluteur de gaz

Les expériences de cinétiques de dégradation des folates en solutions modèles ou sur des purées d'épinards ou d'haricots verts ont été réalisées soit en présence d'un mélange de 40 % d'oxygène et 60 % d'azote ou bien en anoxie (100 % d'azote).

Pour les expériences réalisées avec un mélange contenant 40 % d'oxygène, le mélange a été obtenu à l'aide d'un diluteur de gaz Gasmix (Alytech, Juvisy sur Orge, France). Une bouteille d'azote et une bouteille d'oxygène sont reliées au diluteur de gaz. Le programme

informatique associé permet de faire un mélange de gaz, un mélange en concentration de 40 % d'oxygène avec 60 % d'azote, avec un débit en sortie du mélange de 322 Nml.min⁻¹.

Pour les expériences en anaérobie, le flux d'azote a été introduit directement dans le réacteur avec un débit de 5 ml.min⁻¹.

Dans les deux cas, les flux de gaz ont été appliqués pendant toute la durée de l'expérience. Le flux d'azote a été amené par un capillaire jusqu'au niveau du condenseur. Le flux du mélange azote/oxygène a été amené par un capillaire qui était placé dans le réacteur.

Les concentrations en oxygène, au début, pendant et à la fin de chaque cinétique ont été déterminées à l'aide du capteur d'oxygène optique Fibox 3 LCD trace (Presens, Regensburg, Allemagne), présenté dans la Figure 5. Le capteur d'oxygène fonctionne selon le principe de l'extinction de fluorescence dynamique. Le capteur contient un complexe de ruthénium, composé fluorescent qui est excité par une lumière à une longueur d'onde donnée. En fonction de la quantité de molécules d'oxygène présentes, la durée de la réponse de fluorescence du capteur optique varie. La fibre optique transmet la lumière d'excitation au capteur et, en même temps, transmet la réponse de fluorescence de la sonde à l'appareil de mesure. La fibre optique n'est pas en contact avec le capteur ce qui permet une mesure non invasive à travers la paroi transparente.

Le composé sensible à l'oxygène est immobilisé dans une matrice de polymère (pastille rose de la Figure 25). Cette matrice de polymère peut être appliquée à la matière support (dans le cas du réacteur utilisé, sur la paroi en verre) et utilisée comme points de capteur ou être appliquée directement sur la fibre optique.

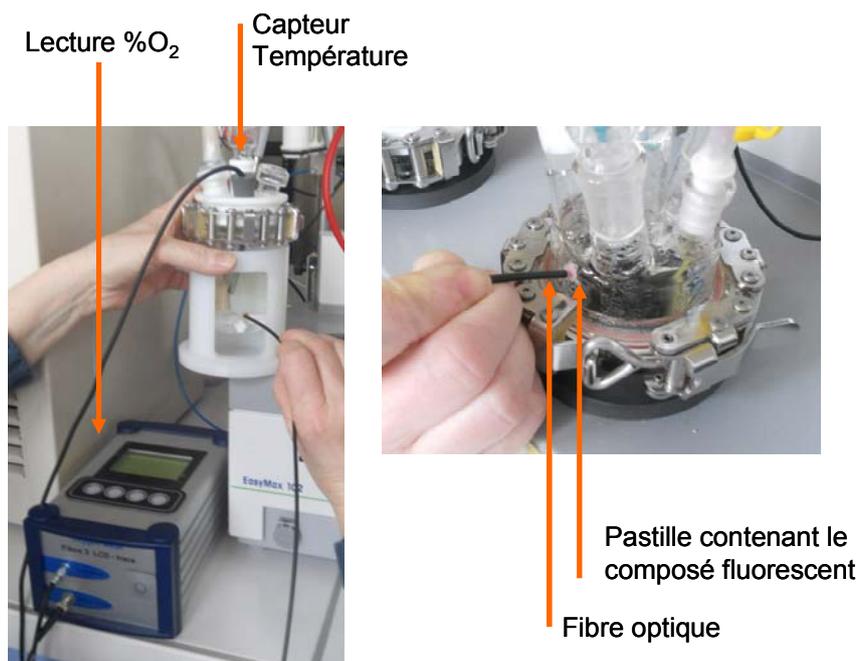


Figure 25: Instrumentation de mesure de l'oxygène

3.2.2 Dégradation thermique de l'acide folique et de l'acide 5-CH₃-H₄folate

3.2.2.1 Solutions mères

Une solution mère d'acide folique (Shircks labs., Jona, Suisse) a été préparée à une concentration de 1.10^{-4} mol.l⁻¹, aliquotée dans des tubes de type eppendorf de 1 ml puis conservés à -20 °C. Une solution mère de 5-CH₃-H₄folate (Schircks labs., Jona, Suisse) a été préparée à une concentration de 1.10^{-4} mol.l⁻¹, aliquotée dans des tubes de type eppendorf de 1 ml puis conservés à -20 °C.

3.2.2.2 Réalisation des cinétiques

Les cinétiques de dégradation ont été réalisées à deux conditions de pH, à pH 7 dans du tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹) et à pH 5 dans du tampon phosphate citrate (0,1 mol.l⁻¹). Les cinétiques ont été faites en absence d'oxygène ou en présence d'un mélange de 40 % d'oxygène avec 60 % d'azote et à quatre températures différentes : 25, 45, 65 et 85 °C.

Le tampon a été mis à barboter soit sous un flux d'azote (pour les expériences en anoxie) soit sous un flux d'un mélange 40 % d'oxygène avec 60 % d'azote (pour les expériences en présence de 40 % d'O₂). Le pourcentage d'oxygène a été déterminé à l'aide de la sonde Fibox présents à la fin du barbotage. Le réacteur a été mis en chauffe sous agitation à 200 rpm pour

atteindre la température cible. Un flux d'azote, avec un débit de 5 ml.min⁻¹ ou un flux d'azote/oxygène à 40 %, à un débit de 322 Nml.min⁻¹, a été injecté en continu tout au long de l'expérience. Lorsque la température cible a été atteinte dans le réacteur, la cinétique a été démarrée. 100 µl de solution mère de 5CH₃-H₄Folate ou d'acide folique ont été injectés dans le réacteur, pour obtenir une concentration finale dans le réacteur de 1.10⁻⁷ mol.l⁻¹. Le nombre de répétitions pour chacune des cinétiques et leur codification sont présentés dans le Tableau 19.

Les prélèvements ont été effectués toutes les 10 minutes pendant 3 heures. Les aliquots ont été mis au congélateur à -20 °C.

Tableau 19 : Codification des prélèvements des cinétiques de dégradation thermique des folates en solution modèle.

Standard	pH	Conditions		Temps	Répétitions		
		Oxygène	Température (°C)				
5-CH ₃ -H ₄ Folate	7	- O ₂	25	0	1-2-3		
			85		1-2-3		
		+ O ₂	25		10	1	
			85		20	1-2-3	
		5	- O ₂		25	30	1
					45	40	1
	65			50	1		
	85			60	1		
	+ O ₂	25	70	1-2			
		65	80	1-2			
		85	90	1-2			
	Acide folique	7	- O ₂	25	100	1	
85				110	1-2-3		
+ O ₂			25	120	1		
			85	130	1-2		
5			- O ₂	25	140	1-2-3	
				45	150	1	
		65		160	1		
		85		170	1-2-3		
+ O ₂		25	180	1-2-3			
		85		1-2			

+O₂ : expériences réalisées sous un débit de 322 Nml/min d'un mélange d'oxygène à 40 % et d'azote à 60 %.

- O₂ : expériences réalisées sous un débit de 5 ml/min d'azote (100%)

3.2.3 Dégradation thermique des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts

3.2.3.1 Préparation des purées

Les cinétiques de dégradation des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts ont été réalisées à partir de légumes en conserve. Les haricots verts (marque Bonduelle, poids net égoutté 220 g, contenance 425 ml) et les épinards (marque de distributeur Cora, contenance 425 ml, poids net égoutté 265 g) ont été achetés au supermarché (Cora, Massy) en Février 2012. Les boîtes de conserves ont été ouvertes et les légumes égouttés à l'aide d'une écumoire. 50 g d'épinards ou de haricots vert ont été pesés et 100 ml d'eau milliQ ont été ajoutés. Le mélange a été broyé à l'ultraturax à 12 000 rpm (modèle S25 18G, IKA, Staufen, Allemagne). Le pH de la purée a été mesurée et un échantillon de purée a été congelé (l'échantillon a été nommé « cru »). Les purées d'épinards ont été diluées au demi dans de l'eau milliQ.

3.2.3.2 Réalisation des cinétiques

La purée a été mise à barboter sous un flux d'azote ou sous un flux d'un mélange de 40 % d'oxygène avec 60 % d'azote, sous agitation à 200 rpm. La teneur en oxygène a été déterminée dans l'espace de tête du réacteur et dans la purée à l'aide de la sonde Fibox presens. Lorsque le pourcentage d'oxygène cible a été atteint, les purées ont été mises en chauffe dans le réacteur. Lorsque la température cible (45, 65 ou 85 °C) a été atteinte, la cinétique a été démarrée. Les échantillons ont été prélevés à $t = 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 150 ; 180 ; 210$ et 240 minutes. Chaque aliquot a été placé directement au congélateur à -20 °C. Deux cinétiques ont été réalisées pour chaque condition sur des lots indépendants d'épinards et d'haricots verts.

La codification des échantillons prélevés est présentée dans le tableau 20 pour les purées d'épinards et dans le tableau 21 pour les purées de haricots verts.

Tableau 20 : Codification des échantillons des cinétiques de dégradation thermique des folates dans les purées d'épinards.

Légume	Condition d'oxygène	Température (°C)	Répétitions
EPI	+ O ₂	45	Lot 1 – Lot 2
		65	
	- O ₂	45	
		65	
		85	
		85	

+O₂ : expériences réalisées sous un débit de 322 Nml/min d'un mélange d'oxygène à 40 % et d'azote à 60 %.
 - O₂ : expériences réalisées sous un débit de 5 ml/min d'azote (100%)

Tableau 21 : Codification des échantillons des cinétiques de dégradation thermique des folates dans les purées de haricots verts.

Légume	Condition d'oxygène	Température (°C)	Répétitions
HV	+ O ₂	45	Lot 1 – Lot 2
		65	
	- O ₂	45	
		65	
		85	
		85	

+O₂ : expériences réalisées sous un débit de 322 Nml/min d'un mélange d'oxygène à 40 % et d'azote à 60 %.
 - O₂ : expériences réalisées sous un débit de 5 ml/min d'azote (100%)

4. Diffusion des folates à partir d'épinards et des haricots verts déstructurés

4.1.1 Dispositif expérimental

Les expériences de diffusion des folates ont été réalisées à partir d'épinards et d'haricots verts cuits. La cuisson a été faite dans 15 l de tampon chauffé à l'aide d'un trépied à gaz. Les légumes ont ensuite été placés dans 15 l de tampon pour les cinétiques de diffusion.

Le dispositif expérimental développé pour les cinétiques de diffusion des folates à partir d'épinards et de haricots verts cuits est présenté dans la Figure 26.

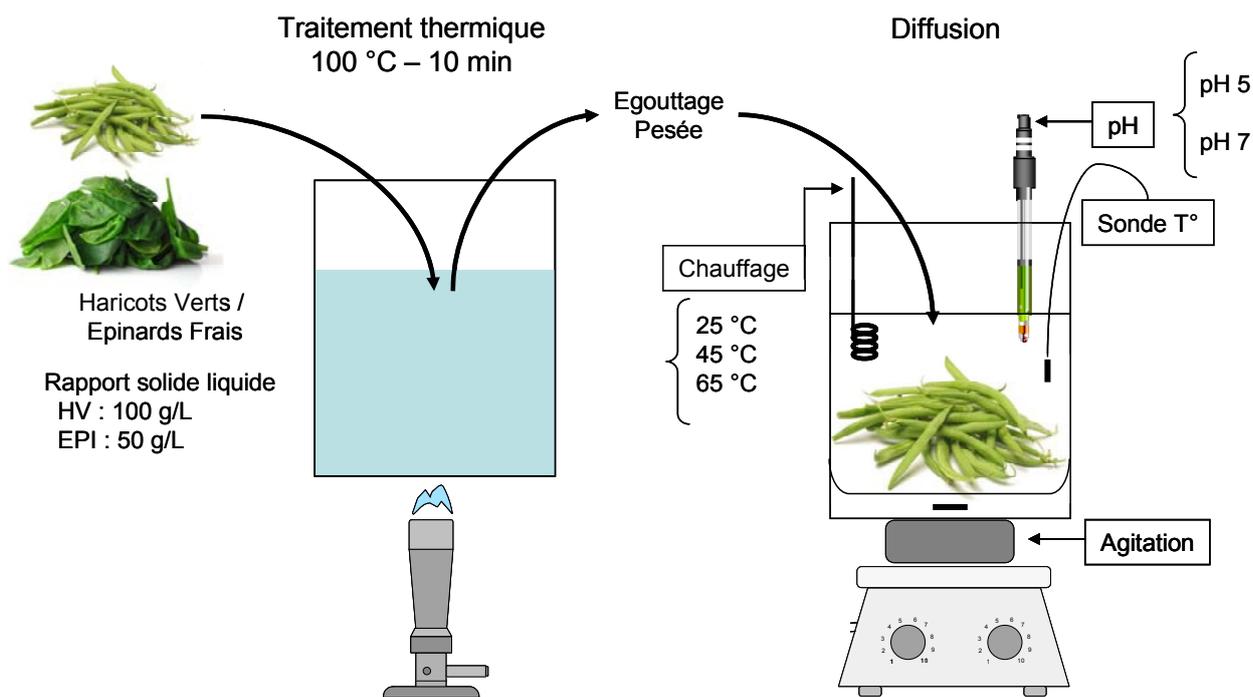


Figure 26: Dispositif expérimental pour l'étude de la diffusion des folates

4.1.2 Préparation du matériel végétal

Des épinards et des haricots verts frais ont été achetés au supermarché (Auchan, Avignon), le jour de l'expérience ou sinon conservés à 4 °C pendant un maximum de 48 h.

Un aliquot du matériel végétal frais a été stabilisé par congélation à l'azote liquide pour chacune des expériences de diffusion.

Les épinards et les haricots verts, avant cuisson le jour de l'expérience, ont été pesés afin d'obtenir un rapport solide-liquide de 50 g/l pour les épinards et 100 g/l pour les haricots verts.

La cuisson a été effectuée par un traitement thermique à 100 °C pendant 10 min dans du tampon phosphate (0,01 mol.l⁻¹ ; pH 7) ou dans du tampon phosphate citrate (0,01 mol.l⁻¹ ; pH 5). Pour ce faire, les épinards et les haricots verts ont été plongés dans le tampon à ébullition dans une cocotte en inox sans couvercle, à pression atmosphérique. Les 10 minutes de traitement thermique ont été décomptées après reprise de l'ébullition du tampon ; en moyenne, 3,3 minutes pour les épinards et 5,3 minutes pour les haricots verts. La reprise de l'ébullition a été contrôlée à l'aide d'une sonde de température (Sonde température CTX 1300, Bioblock Scientific, Illkirch, France). A la fin des 10 minutes de cuisson, les épinards et

les haricots verts ont été égouttés et pesés puis transférés immédiatement dans le tampon pour le suivi de la cinétique de diffusion.

4.1.3 *Cinétique de diffusion*

Après cuisson, les légumes ont été placés dans le tampon (tampon phosphate pH 7 ou tampon citrate phosphate pH 5), le t_0 de la cinétique a été prélevé. Les prélèvements ont été effectués pendant 4 heures à $t = 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 150 ; 180 ; 210$ et 240 minutes. A chaque point de prélèvement, les épinards et les haricots verts ont été égouttés, pesés (environ 35 g) et stabilisés par congélation à l'azote liquide.

Les cinétiques de diffusion ont été faites dans deux tampons différents, du tampon phosphate, $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7 et du tampon citrate phosphate $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ pH 5 ; à trois températures différentes : 25 °C, 45 °C et 65 °C. La température a été maintenue constante tout au long de la cinétique à l'aide d'un thermorégulateur (Polystat 22, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les températures ont été enregistrées tout au long de la cinétique à l'aide d'une sonde enregistreuse (sonde de type SPY RF U1, JRI Maxant, Fresche le Chatel, France). Le pH a été contrôlé tout au long de la cinétique à l'aide du pH-mètre (Mettler Toledo Five Easy FE20, VWR, Fontenay sous bois, France). Les cinétiques de diffusion ont été réalisées sous agitation du tampon par deux agitateurs magnétiques (Rotamag 12, Prolabo, Fontenay sous bois, France) et de deux barreaux aimantés en forme de croix de 7 cm de long (VWR, Fontenay sous bois, France), à vitesse maximale. Trois lots indépendants d'épinards et de haricots verts ont été utilisés pour les cinétiques de diffusion pour chacune des trois températures (25, 45 et 65 °C) à pH 7. Deux lots indépendants d'épinards et d'haricots verts ont été utilisés pour les cinétiques de diffusion à pH 5, pour les trois températures (25, 45 et 65°C).

A la fin de la cinétique de diffusion, les épinards et les haricots verts restants ont été égouttés et pesés. Le tampon de diffusion a lui aussi été pesé à la fin de la cinétique. 1 l de tampon, en fin de diffusion, a été aliquoté afin d'être lyophilisé.

L'ensemble des échantillons ont été broyés à l'azote liquide (Broyeur IKA, modèle A 11 Basic, Staufen, Allemagne) et conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

La codification des échantillons utilisée pour les expériences de diffusion est présentée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Codification des échantillons des cinétiques de diffusion des folates à partir de haricots verts et d'épinards cuits.

Légumes	pH	Température (°C)	Répétitions	Temps prélèvement (min)		
HV	7	25	Lot 1-2-3	0		
		45	Lot 1-2-3	2,5		
		65	Lot 1-2-3	5		
	5	25	Lot 1-2	7,5		
			45	Lot 1-2	10	
			65	Lot 1-2	15	
		7	25	Lot 1-2-3	20	
				45	Lot 1-2-3	30
				65	Lot 1-2-3	60
EPI	5	25	Lot 1-2	90		
		45	Lot 1-2	120		
		65	Lot 1-2	150		
	7	25	Lot 1-2	180		
			45	Lot 1-2	210	
			65	Lot 1-2	240	

5. Méthodes analytiques

5.1 Dosage des folates totaux par HPLC et détection en fluorimétrie après dérivatisation.

5.1.1 Principe de la méthode

Les différents dérivés de folates sont présents, dans les aliments, sous forme de polyglutamates. Leur dosage (Figure 27) nécessite le clivage des résidus glutamate par l'action d'une enzyme appelée la γ -glutamyl-carboxypeptidases ou la déconjugase. La déconjugaison est effectuée par la déconjugase issue de pancréas de poulet lyophilisé et broyé, qui hydrolyse les formes polyglutamates en forme diglutamate. Après hydrolyse des résidus glutamate, l'ensemble des dérivés de folates est réduit chimiquement en une seule forme qui est le 5-CH₃-H₄folate monoglutamate et/ou diglutamate.

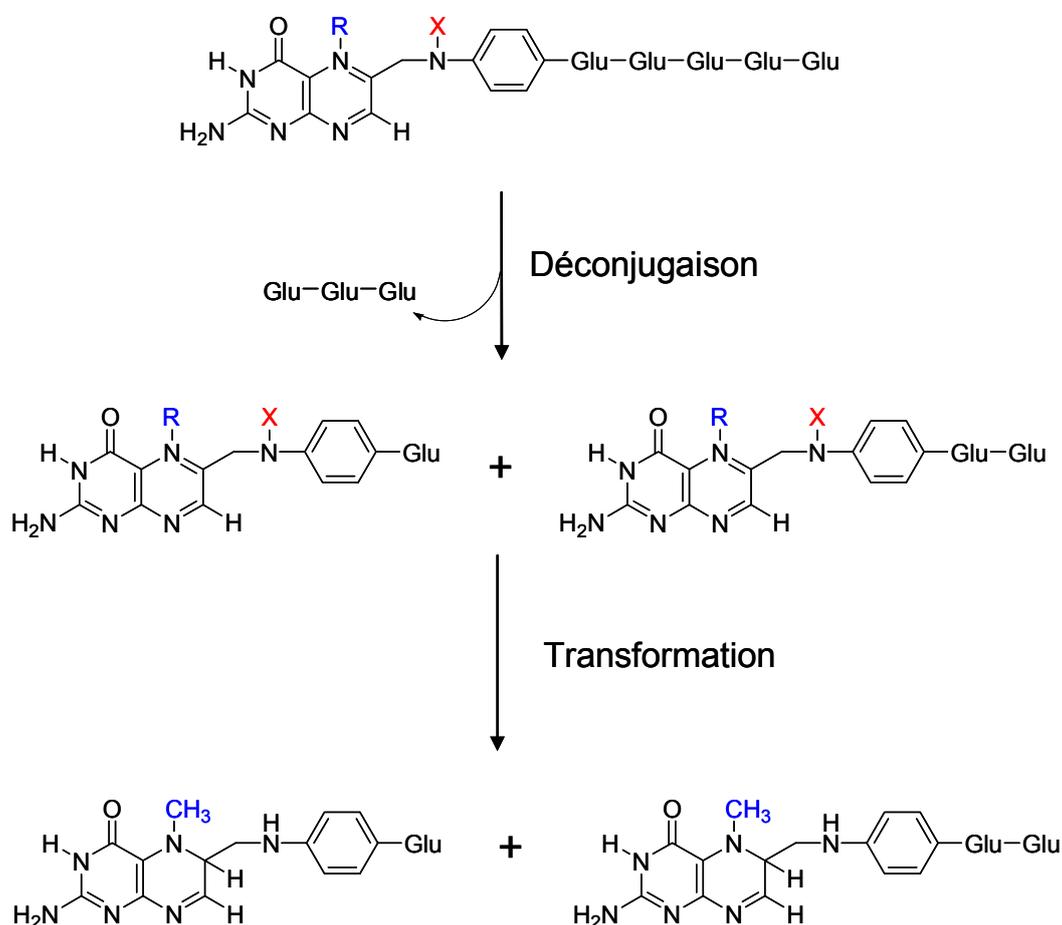


Figure 27 : Principe du dosage des folates totaux

R et X indique les différentes substitutions en fonction des dérivés de folates (voir Chapitre 1, paragraphe 1.1.1) ; Glu : glutamate.

Le 5-CH₃-H₄folate monoglutamate et/ou diglutamate est par la suite quantifié par fluorimétrie après purification par chromatographie d'affinité et isolement de ce composé par HPLC.

Le dosage des folates totaux a été réalisé d'après le protocole de Ndaw *et al.* (2001).

5.1.2 Extraction et déconjugaison

30 ml de tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7) contenant 0,1 g.l⁻¹ d'acide ascorbique sont ajoutés à 10 g du broyat congelé de l'échantillon, dans un bécher de 150 ml. Le bécher est ensuite placé dans un bain marie à 100 °C pendant 10 minutes. Après refroidissement, le tout est transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml. Le volume est ajusté à l'aide du tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7) contenant 0,1 g.l⁻¹ d'acide ascorbique. Le contenu de la fiole jaugée est transféré dans un tube de type falcon de 50 ml et centrifugé (Jouan CR 3i multifonction, Thermo electron corporation, France) à 5000 g pendant 10 minutes à 4 °C.

La solution de déconjugase de pancréas de poulet est préparée en dissolvant 500 mg de poudre de pancréas de poulet lyophilisé et broyé dans 30 ml de tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7) pendant 15 minutes. Le volume est ajusté à 50 ml avec du tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7), le tout est transféré dans des tubes de type falcon de 50 ml puis centrifugé (Jouan CR 3i multifonction, Thermo electron corporation, France) à 5000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est aliquoté dans des tubes de type Eppendorf de 1 ml et conservé à -20 °C.

10 ml de surnageant sont récupérés et 1 ml de solution de déconjugase de pancréas de poulet à une concentration de 10 mg.ml⁻¹ est ajouté. Le tout est placé à l'étuve (étuve marque Memmert, Allemagne) à 37 °C sous agitation pendant 2 heures.

5.1.3 Dérivatisation des dérivés de folates en acide 5-méthyltétrahydrofolique

5 ml de tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7) contenant 4 g.l⁻¹ d'acide ascorbique, 15 ml de tampon Tris (0,066 mol.l⁻¹ ; pH 7,8), 1 ml de 2-octanol et 10 ml d'une solution de borohydrure de sodium (NaBH₄) à 120 g.l⁻¹ sont ajoutés successivement à l'échantillon déconjugué. Après agitation la solution est laissée au repos pendant 10 minutes. Le pH est ensuite ajusté à 7,4 à l'aide d'acide acétique à 5 mol.l⁻¹ avant l'ajout de 80 µl de formaldéhyde à 37 % (g/g). Après agitation, 10 ml de solution de NaBH₄ sont versés. Le pH est immédiatement ajusté à une valeur inférieure à 1 avec de l'acide chlorhydrique fumant. La

solution est laissée au repos pendant 10 minutes. Le pH est porté à 5 avec de la soude à 5 mol.l⁻¹ et 10 ml de NaBH₄ sont ajoutés. La solution est laissée au repos pendant 20 minutes jusqu'à l'arrêt complet de la réduction, c'est-à-dire l'arrêt de la formation de bulles dans la solution.

La solution est versée dans une fiole jaugée, le volume ajusté à 100 ml avec du tampon Tris (0,066 mol.l⁻¹ ; pH 7,8). 10 ml de solution transformée sont filtrés à l'aide de filtre à seringue de type Millex-AA, 0,80 µm, 25 mm (Millipore, St Quentin en Yvelines, France) pour être purifiés par chromatographie d'affinité.

5.1.4 Purification du 5-CH₃-H₄folate mono et diglutamate par chromatographie d'affinité

5.1.4.1 Préparation des colonnes de chromatographie

12 ml de gel d'agarose sont prélevés et transférés dans un entonnoir en verre avec un fritté de porosité 1. Le surnageant est éliminé grâce à une pompe à vide. Le gel est lavé avec une solution froide à 4 °C d'acétate de sodium (0,01 mol.l⁻¹ ; pH 4,5). Le gel est ensuite transféré dans une solution de Folate Binding Protein (FBP).

La solution de FBP est préparée en dissolvant 3 mg de FBP dans 9 ml de solution froide (4 °C) de carbonate de sodium (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 6,5). La suspension composée du gel d'agarose et de la FBP est mise sous agitation lente une nuit à 4 °C. Après une nuit, la solution d'éthanolamine (1,2 ml, 1 mol.l⁻¹ ; pH 8) est ajoutée et la suspension est mise sous agitation 1 h à 4 °C. Le tout est laissé décanter quelques minutes puis le surnageant, contenant les particules les plus fines, est éliminé. Le gel est ensuite réparti dans 6 colonnes. Les colonnes sont lavées avec 10 ml de solution de carbonate de sodium (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 6,5) puis avec 10 ml de tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7). 5 ml d'azide de sodium à 2 g.l⁻¹ sont passés sur les colonnes et elles sont conservées dans la solution d'azide de sodium.

5.1.4.2 Purification des échantillons

Les colonnes sont conditionnées par un passage de 5 ml de tampon phosphate (0,1 mol.l⁻¹ ; pH 7). 10 ml de l'échantillon transformé sont déposés sur les colonnes, qui sont ensuite lavées avec 10 ml de tampon phosphate (0,025 mol.l⁻¹ ; pH 7). Les folates sont ensuite élués avec une solution de DL-dithiothréitol (0,02 mol.l⁻¹) et d'acide trifluoroacétique (0,02 mol.l⁻¹). L'éluution des folates se fait dans des fioles jaugées de 10 ml contenant 40 µl d'hydroxyde de

sodium à 0,6 g.l⁻¹ et 200 µl d'une solution d'acide ascorbique à 250 g.l⁻¹. Le volume final d'éluat est ajusté à 10 ml avec la solution d'éluat. 1 ml d'éluat est filtré à l'aide d'un filtre à seringue de type Millex-AA, 0.45 µm, 25 mm (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Les colonnes sont ensuite reconditionnées pour être conservées à 4 °C par passage de 5 ml d'azide de sodium à 2 g.l⁻¹.

5.1.5 Détermination de la concentration des folates totaux par HPLC

5.1.5.1 Analyse HPLC

L'analyse des folates est effectuée à l'aide d'une HPLC équipée d'un détecteur fluorimétrique (RF-10AXL, Shimadzu inc., Kyoto, Japan). La détection par fluorimétrie est enregistrée à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm et une longueur d'onde d'émission de 356 nm. Une colonne LiChrospher 100RP-18 ; 250 x 4,5 mm ; 5 µm (Altech, Eppernon, France) équipée d'une pré-colonne LiChrospher RP-18 All Guard 7,5 x 4,6 mm (Altech, Eppernon, France) est utilisée.

Les phases mobiles utilisées sont un mélange d'eau milliQ et d'acide formique à 10 ml.l⁻¹ (Phase mobile A) et d'acétonitrile (Phase mobile B). Le gradient utilisé pour l'analyse est présenté dans le Tableau 23.

Tableau 23: Gradient d'éluat utilisé pour l'acide 5-CH₃-H₄folate mono et diglutamate

Temps (min)	% Phase mobile B : Acétonitrile
0	5
25	100
40	100
50	5
60	5

Phase mobile A : mélange eau / acide formique à 10 ml.l⁻¹

Le débit des phases mobiles est de 0,8 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 25 µl.

5.1.5.2 Quantification

La quantification des folates est basée sur une calibration externe du 5-CH₃-H₄folate monoglutamate et du 5-CH₃-H₄folate diglutamate. Les droites de calibrations sont comprises entre 1.10⁻⁹ mol.l⁻¹ et 6.10⁻⁸ mol.l⁻¹ pour le 5-CH₃-H₄folate monoglutamate avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,996$ et entre 5.10⁻⁹ mol.l⁻¹ et 1.10⁻⁷ mol.l⁻¹ pour le 5-CH₃-H₄folate diglutamate avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,999$.

5.1.6 Détermination des folates totaux dans les liquides de cuisson et de recouvrement

10 ml de liquide de cuisson ou de liquide de recouvrement ont été décongelés, 1 ml de solution de déconjugase de pancréas de poulet à une concentration de 10 mg/ml a été ajouté pour la déconjugaison pendant 2 h à 37 °C sous agitation. La transformation des différents dérivés en 5-CH₃-H₄folate a été faite comme décrit précédemment au paragraphe 5.1.3. Les échantillons ont par la suite été purifiés comme décrit au paragraphe 5.1.4.2. et analysés par HPLC comme décrit au paragraphe 5.1.5.

5.2 Dosage des différents dérivés par Dilution d'Isotopes Stables

5.2.1 Principe de la méthode

Le dosage par dilution d'isotopes stables repose sur l'ajout à l'échantillon de l'homologue de l'analyte dans lequel certains atomes, l'atome d'hydrogène dans le cas du dosage des folates, sont remplacés par un isotope stable, le deutérium pour le dosage des folates.

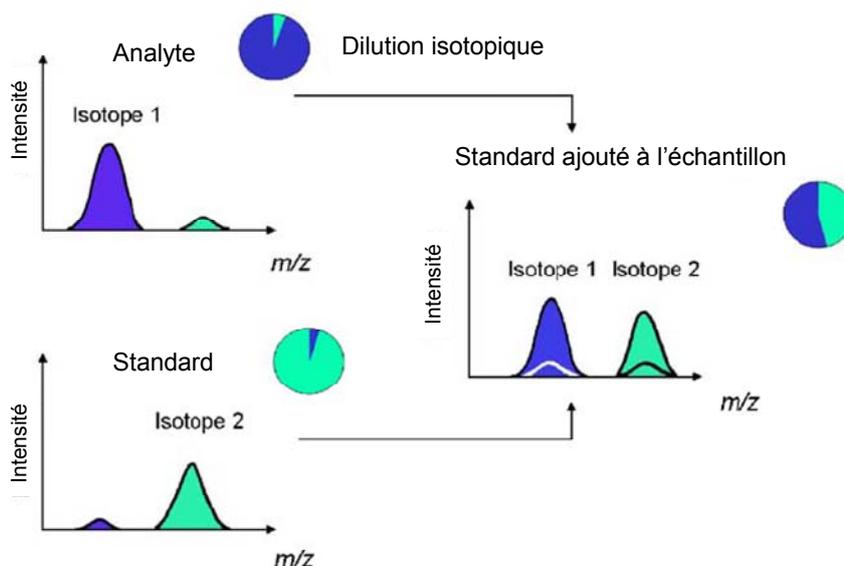


Figure 28: Principe de la dilution isotopique (d'après Rychlik, 2008)

Une quantité connue de standard deutéré est ajoutée à l'échantillon afin de faire en sorte que la distribution du standard soit homogène (Figure 28). Du fait des propriétés physico-chimiques similaires de l'analyte et du standard, la perte de l'analyte au cours de la préparation est compensée. Par conséquent, l'erreur de la mesure analytique est réduite au minimum. La concentration en analyte est déterminée par LC-MS via les aires du pic de l'analyte et du standard selon l'Equation 1.

$$n(A) = Rf \times \frac{A(A)}{A(S)} \times n(s)$$

Équation 1

Le facteur de réponse (Rf) est déterminé avant l'analyse par l'injection d'un mélange de standard et de standard deutéré dans lequel les concentrations des deux standards sont connues. Le facteur de réponse est calculé par le ratio entre les aires et les quantités.

5.2.2 Extraction, dilution isotopique et déconjugaison

Afin de limiter la dégradation des différents dérivés de folates, l'ensemble des étapes de l'expérience sont réalisées dans l'obscurité.

10 ml de tampon MES, composé de 0,22 mol.l⁻¹ de MES hydrate, 20 g.l⁻¹ d'acide ascorbique et 13,95 ml.l⁻¹ de β-mercaptoéthanol, à pH 5 sont ajoutés à 1 g de poudre d'échantillon d'épinards et d'haricots verts ; et à 2 g de poudre d'échantillon d'haricots verts « produit fini ».

Les standards internes sont ajoutés comme suit :

- Pour les échantillons d'épinards : 100 µl d'un mélange de [²H₄]5-CH₃-H₄folate, [²H₄]5-HCO-H₄folate, [²H₄]10-HCO-PteGlu et [²H₄]H₄folate à 0,4 µg.ml⁻¹ et 50 µl de solution de [²H₄]PteGlu à 0,2 µg.ml⁻¹.
- Pour les échantillons de haricots verts : 50 µl d'un mélange de [²H₄]5-CH₃-H₄folate, [²H₄]5-HCO-H₄folate, [²H₄]10-HCO-PteGlu et [²H₄]H₄folate à 0,4 µg.ml⁻¹ et 30 µl de solution de [²H₄]PteGlu à 0,2 µg.ml⁻¹.

Les échantillons sont ensuite mis sous agitation pendant 15 minutes et chauffés à 100 °C pendant 10 minutes. Ils sont ensuite refroidis dans un bain de glace pendant 10 minutes. 2 ml d'une solution de déconjugase de pancréas de poulet et 150 µl de sérum de rat sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite incubés pendant une nuit à 37 °C dans un bain marie sous agitation (modèle SW22, Julabo, Seelbach, Allemagne). Les échantillons sont chauffés à 100 °C pendant 10 minutes avant d'être refroidis dans un bain de glace pendant 10 minutes. Ils sont ensuite centrifugés (Jouan CR 412, Saint-Herblain, France) à 4000 g pendant 20 minutes, à 4 °C.

Remarque : 10 ml d'acétonitrile ont été ajoutés à la solution avant la centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes pour les échantillons des cinétiques de diffusion (C₀ et C_∞) ainsi que pour les échantillons des cinétiques de dégradation thermique des purées d'épinards et de haricots verts

5.2.3 Purification des différents dérivés

La purification des dérivés est effectuée sur des cartouches SPE SAX (Phenomenex, Aschaffenburg, Allemagne) 500 mg / 3 ml ; 55 μm ; 70 \AA , sous vide. Le conditionnement des colonnes est effectué par le passage successif de 2 volumes d'hexane, 2 volumes de méthanol et 2 volumes de tampon phosphate (0,01 mol.l⁻¹ ; pH 7) contenant 2 ml.l⁻¹ de β -mercaptoéthanol. Ensuite, le surnageant des échantillons est déposé sur les cartouches puis les cartouches sont lavées avec 3 volumes de tampon phosphate (0,01 mol.l⁻¹ ; pH 7) contenant 2 ml.l⁻¹ de β -mercaptoéthanol. Les colonnes sont séchées après le dernier volume de lavage déposé. L'éluion des folates est réalisée avec 2 ml d'une solution éluante composée de 50 g.l⁻¹ de NaCl, 13,6 g.l⁻¹ d'acétate de sodium, 10 g.l⁻¹ d'acide ascorbique et 13,9 ml.l⁻¹ de β -mercaptoéthanol. L'éluat est filtré à l'aide de filtre à seringue de type PVDF 0,22 μm (VWR, Darmstadt, Allemagne) pour l'analyse HPLC.

5.2.4 Détermination de la concentration des différents dérivés

5.2.4.1 Analyse HPLC

L'analyse des différents dérivés de folates est effectuée grâce à une HPLC couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle (API 4000 Q-Trap, AB-Sciex, Foster City, CA, USA). L'analyse est faite à l'aide d'une colonne Hyper Clone BDS C18 130 \AA (3 μm ; 150 x 3,2 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Allemagne). Les phases mobiles utilisées consistent en un mélange d'eau et d'acide acétique à 10 ml.l⁻¹ (Phase mobile A) et d'acétonitrile (Phase mobile B).

Le gradient appliqué lors de l'analyse est présenté dans le Tableau 24.

Tableau 24: Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des dérivés de folates en LC-MS

Temps (min)	% Phase mobile B : Acétonitrile
0	2
2	2
7	10
10	10
18	15
20	100
21	100
23	2
32	2

Phase mobile A : mélange eau / acide acétique 10ml.l⁻¹

Le débit appliqué est de 0,2 ml.min⁻¹ avec un volume d'injection de 10 µl. Pendant les 5 premières minutes et les 9 dernières minutes, l'éluat est versé à la poubelle.

Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté dans la Figure 28B.

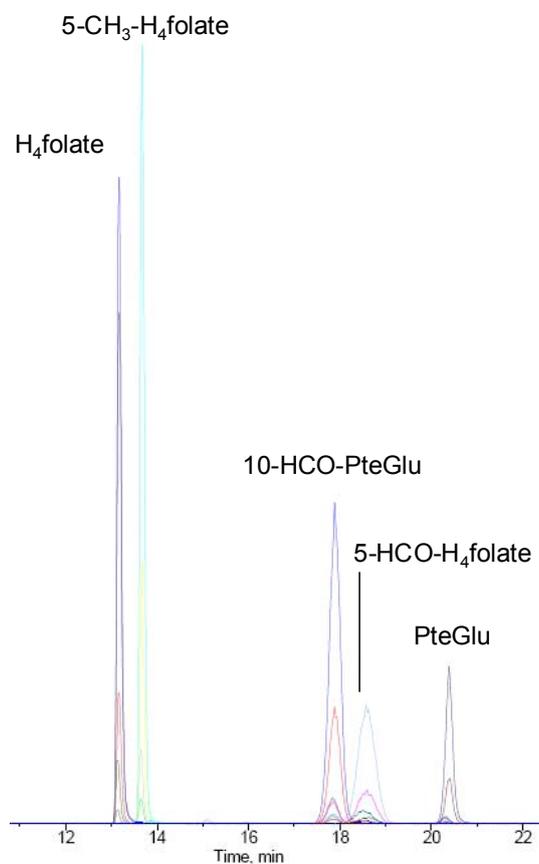


Figure 28B: Chromatogramme obtenu lors de l'analyse des dérivés de folates en LC-MS.

5.2.4.2 Conditions de spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse est constitué d'une chambre d'ionisation par électro-nébulisation fonctionnant en mode positif, suivant le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). L'intensité appliquée pour l'ionisation est de 5 500 V et la pression du gaz de nébulisation de 75 Psi. La température du four est de 550 °C. Les masses des ions précurseurs et fragmentés, ainsi que les paramètres du spectromètre de masse sont décrits dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Conditions de spectrométrie de masse pour l'analyse des dérivés de folates.

Composé	Ion précurseur	Ion fragmenté	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
5-CH ₃ -H ₄ folate	460	313	71	10	29	8
[² H ₄]5-CH ₃ -H ₄ folate	464	317				
5-HCO-H ₄ folate	474	327	66	10	29	14
[² H ₄]5-HCO-H ₄ folate	478	331				
10-HCO-PteGlu	470	295	76	15	35	16
[² H ₄]10-HCO-PteGlu	474	299				
H ₄ folate	442	295	56	8	23	17
[² H ₄] H ₄ folate	446	299				
PteGlu	446	299	66	10	29	16
[² H ₄] PteGlu	450	303				
5,10-CH ⁺ -H ₄ folate	456	412	136	15	41	18
10-HCO-H ₂ folate	472	178	66	10	35	8

DP : Potentiel de désagrégation ; EP : Potentiel entrant ; CE : Energie de collision ; CXP : Potentiel de sortie de cellule.

5.2.4.3 Calcul de la concentration des dérivés

La concentration de chaque dérivé a été calculée à l'aide de la concentration connue des standards deutérés (C_{ISTD}), en utilisant le facteur de réponse associé grâce à l'Equation 2.

$$C_{folate} = \frac{Aire_{folate} \times C_{ISTD}}{RF \times Aire_{ISTD}}$$

Équation 2

La concentration des standards interne (c_{ISTD}) est calculée à partir d'un mélange de standards internes et de standards deutérés, la concentration de chaque dérivé est obtenue par spectrophotométrie UV-Visible. Environ 100 μg de 5- CH_3 - H_4 folate, 5-HCO- H_4 folate, H_4 folate, PteGlu sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate pH 7 avec du β -mercaptoéthanol à une concentration de 13,95 ml.l^{-1} . 100 μg de 10-HCO-PteGlu sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate pH 7. L'absorbance de chaque solution de standard est déterminée par spectrophotométrie et la concentration déterminée à l'aide de la loi de Beer-Lambert. Les longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaires utilisés sont donnés dans le Tableau 26.

Tableau 26: Longueurs d'onde et coefficients d'extinction molaire utilisés pour le calcul des concentrations des différents dérivés

Dérivé	λ (nm)	ε ($\times 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
5- CH_3 - H_4 folate	290	23,7
5-HCO- H_4 folate	288	23,4
H_4 folate	299	27,7
PteGlu	282	27,6
10-HCO-PteGlu	267	22,7

Pour les échantillons des cinétiques de diffusion (C_0 et C_∞) et des cinétiques de dégradation thermique des purées d'épinards et de haricots verts, la concentration des standards a été déterminée par HPLC avec une détection à barrette de diodes (Lachrom L-74 55, Merck Hitachi, Allemagne). La colonne utilisée était une Nucleosil C18 (250 x 3 mm ; 5 μm ; 100 \AA) et la précolonne une Nucléosil C18 (8 x 3 mm ; 5 μm ; 100 \AA) (Macherey Nagel, Düren, Allemagne). Les phases mobiles composées d'eau et d'acide acétique 10 ml.l^{-1} (phase mobile A) et de méthanol (phase mobile B) ont été utilisées. Le gradient appliqué pour l'élution des différents dérivés est présenté dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des dérivés de folates

Temps (min)	% Phase mobile B : Méthanol
0	10
7	10
8	20
9	20
17	30
21	50
23	100
24	100
26	10
35	10

Phase mobile A : mélange eau, acide acétique à 10 ml.l⁻¹

Le débit était de 0,5 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 10 µl.

La quantification de l'acide folique s'est faite à 282 nm, celle du 10-CHO-PteGlu et du H₄folate s'est faite à 272 nm, celle du 5-CH₃-H₄folate et du 5-CHO-H₄folate à 290 nm.

5.3 Dosage de l'acide folique par HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes

Les échantillons de solution modèle ont été directement injectés en HPLC. L'acide folique a été quantifié par HPLC avec une détection à barrette de diodes (SPD-M 20A, Shimadzu, Kyoto, Japon), à 280 nm.

Une colonne LiChrospher 100RP-18 ; 250 x 4,5 mm ; 5 µm (Altech, Eppernon, France) équipée d'une pré-colonne LiChrospher RP-18 All Guard 7,5 x 4,6 mm (Altech, Eppernon, France) a été utilisée. Les phases mobiles composées d'un mélange d'eau avec de l'acide formique à 10 ml.l⁻¹ (phase mobile A) et d'acétonitrile (phase mobile B) ont été utilisées.

Le gradient utilisé pour l'élution de l'acide folique est présenté dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse de l'acide folique

Temps (min)	% Phase mobile B : Acétonitrile
0	5
25	35
30	100
40	100
45	5
60	5

Phase mobile A : mélange eau / acide formique 10ml.l⁻¹

Le volume injecté est de 100 µl et le débit appliqué de 0,8 ml.min⁻¹.

La quantification de l'acide folique est basée sur une calibration externe. La courbe de calibration était de 1.10⁻⁹ mol.l⁻¹ à 1.10⁻⁶ mol.l⁻¹ avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0.999$.

5.4 Dosage des caroténoïdes

5.4.1 Principe de la méthode

Le dosage des caroténoïdes est réalisé par HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes après micro-extraction solide-liquide, adapté du protocole de Sérino *et al.* (2009).

5.4.2 Extraction des caroténoïdes

Environ 300 mg de poudre d'épinards ou d'haricots verts sont pesés dans des microtubes de 2 ml à bouchons vissés de type Eppendorf (Dutscher, Brumath, France) contenant environ 100 mg de billes de zirconium (Biospec products inc., VWR, Fontenay sous bois, France). 10 µl d'une solution d'apocaroténal à 0,2 mg.ml⁻¹ (standard interne), 100 µl d'une solution de NaCl saturée et 50 µl d'hexane sont ajoutés. Le tout est agité à l'aide d'un agitateur de type Fastprep (puissance 6) (Fast Prep FP 120, Thermo, Villebon sur Yvette, France), pendant 40 s. L'échantillon est ensuite centrifugé (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Dutscher, Brumath, France) pendant 2 minutes à 9500 g. 200 µl de dichlorométhane sont ajoutés et l'échantillon est agité à l'aide de l'agitateur de type Fastprep (puissance 6), pendant 40 s et centrifugé pendant 2 minutes à 9500 g. 800 µl d'acétate d'éthyle sont rajoutés. L'échantillon

est agité à l'aide de l'agitateur de type Fastprep (puissance 6), pendant 40 s puis centrifugé pendant 5 minutes à 9500 g. La phase organique supérieure est récupérée.

50 µl d'hexane sont ajoutés à la phase organique inférieure. L'échantillon est agité à l'aide de l'agitateur de type Fastprep (puissance 6), pendant 40 s puis centrifugé pendant 2 minutes à 9500 g. 200 µL de dichlorométhane sont ajoutés et l'échantillon est agité à l'aide d'un agitateur de type Fastprep (puissance 6), pendant 40 s et centrifugé pendant 2 minutes à 9500 g. 800 µL d'acétate d'éthyle sont rajoutés. L'échantillon est agité à l'aide d'un agitateur de type Fastprep (puissance 6), pendant 40 s puis centrifugé pendant 5 minutes à 9500 g. La phase organique supérieure est récupérée et ajoutée à la phase organique récupérée lors du premier cycle d'extraction. L'extrait est filtré à l'aide de filtre à seringue PTFE 0,45 µm Titan (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) dans un flacon pour HPLC.

5.4.3 Analyse HPLC

L'analyse de la lutéine est effectuée à l'aide d'une HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes (SPD-M20A Shimadzu inc., Kyoto, Japan). Une colonne de type YMC C30 (250 x 4,6 mm ; 3µm) (Interchim, Montluçon, France) est utilisée. La quantification de la lutéine se fait à une longueur d'onde de 450 nm. Les phases mobiles sont constituées de méthanol (phase mobile A) et de tert-methyl-butyl-ether [MTBE] (phase mobile B). Le gradient appliqué pour l'analyse est présenté dans le Tableau 29.

Tableau 29: Gradient d'élution utilisé pour l'élution des caroténoïdes.

Temps (min)	% Phase mobile B : MTBE
0	0
40	60
45	0
55	0

Phase mobile A : Méthanol

Le débit était de 1,4 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de 20 µl.

5.4.4 Quantification de la lutéine

La quantification de la lutéine est basée sur une calibration externe de $4,99 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ à $2,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,9994$. La concentration des solutions utilisées pour la courbe de calibration a été contrôlée par spectrophotométrie, en utilisant la loi de Beer-Lambert et le coefficient d'extinction molaire donné par Britton (1995).

5.5 Dosage de la vitamine C totale par microplaque

5.5.1 Principe de la méthode

Le dosage de la vitamine C totale est un dosage indirect (Figure 29), par colorimétrie, du complexe coloré formé entre le 2,2-dipyridyl et le chlorure ferrique. Le déshydroascorbate est réduit par le DL-dithiothréitol en acide ascorbique. L'acide ascorbique (endogène et formé) réduit l'ion Fe^{3+} en Fe^{2+} qui va se complexer avec le 2,2-dipyridyl. Le complexe formé sera détecté par spectrophotométrie à 525 nm.

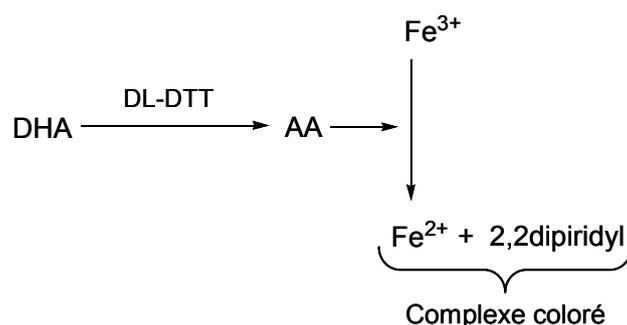


Figure 29 : Formation du complexe Fe^{2+} 2,2dipyridyl lors du dosage de la vitamine C
AA : Acide ascorbique ; DHA : Acide déshydroascorbique ; DL-DTT : DL-dithiothréitol

5.5.2 Extraction de la vitamine C

400 mg de poudre d'épinards ou de haricots verts sont prélevés et directement placés dans un tube de type Eppendorf de 2 ml contenant 600 μl de solution froide d'acide trichloroacétique à 0,6 mg.l^{-1} . Le mélange est vortexé jusqu'à l'homogénéisation complète, et centrifugé (modèle 1K15 ; Bioblock Scientific, Illkirch, France) à 15 500 g pendant 15 minutes à 4 °C.

5.5.3 Le réactif de coloration

Le réactif de coloration est obtenu à partir du mélange de 6,6 ml de solution A et de 2,4 ml de solution B. La solution A est composée d'acide orthophosphorique (85 %) à 0,185 ml.ml^{-1} , de

TCA à 23 mg.ml^{-1} et de chlorure ferrique à 3 mg.ml^{-1} . La solution B est composée de 2,2-dipyridyl à 40 mg.ml^{-1} dissous dans de l'éthanol à 70 % (v/v).

5.5.4 *Dosage de la vitamine C totale*

20 μl de surnageant sont déposés dans les puits de la microplaque. 20 μl de solution de DL-dithiotréitol à $0,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ solubilisés dans du tampon phosphate à $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ à pH 7,4 sont ajoutés. La plaque est agitée pendant 20 s. La plaque est laissée au repos à l'obscurité pendant 20 minutes, pour la réduction complète du déhydroascorbate en acide ascorbique. 10 μl de solution de N-éthylmaléimide à 5 mg.ml^{-1} sont ajoutés et la plaque est agitée pendant 20 s. 80 μl de réactif de coloration sont ajoutés avec l'injecteur automatique (Ingenius 6009, Safas, Monaco), la plaque est agitée durant toute la durée de l'analyse. L'agitation est stoppée avant chaque lecture de DO. La lecture de la DO est enregistrée à 525 nm. L'intervalle entre deux mesures est de 2 minutes jusqu'à atteindre le plateau.

5.5.5 *Dosage de l'acide ascorbique.*

20 μl de surnageant sont déposés dans les puits de la microplaque. 20 μl de tampon phosphate $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ à pH 7,4 sont ajoutés. La plaque est agitée pendant 20 s et laissée au repos à l'obscurité pendant 20 minutes. 10 μl de tampon phosphate $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ à pH 7,4 sont ajoutés, la plaque est agitée pendant 20 s. La séquence automatique (logiciel SP 2000, version 6.12.17, Safas, Monaco) du spectrofluorimètre à microplaque (Xenius, Safas, Monaco) est lancée, 80 μl de réactif de coloration sont ajoutés par l'injecteur automatique (Injenius 6009, Safas, Monaco), la plaque est agitée durant toute la durée de l'analyse. L'agitation est stoppée avant chaque lecture de DO. La lecture de la DO est enregistrée à 525 nm. L'intervalle entre deux mesures est de 2 minutes jusqu'à atteinte du plateau.

5.5.6 *Calcul des concentrations*

La concentration en vitamine C totale est déterminée par spectrophotométrie à l'aide d'une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique de 0 à $1,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

5.6 Dosage des sucres et acides

5.6.1 Dosage des sucres

5.6.1.1 Principe de la méthode

Les concentrations en glucose, en fructose et en saccharose sont déterminées indirectement par dosage du NADPH par spectrophotométrie.

La concentration en glucose dans les échantillons est calculée à partir de la concentration de NADPH formé au cours des réactions enzymatiques (Figure 30) de conversion du glucose en D-Gluconate-6-phosphate. Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate. Cette réaction est catalysée par l'héxokinase ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate va être oxydé en gluconate-6-phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Cette réaction d'oxydation nécessite dans un même temps la réduction du NADP^+ en NADPH.

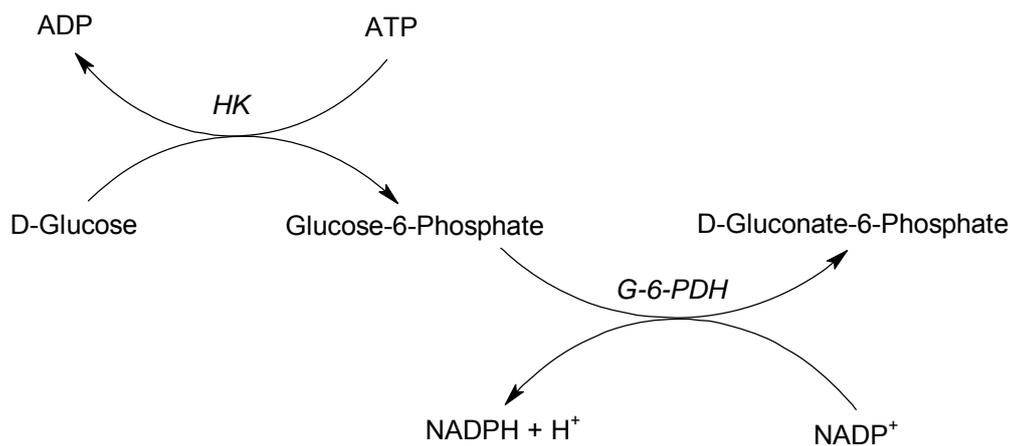


Figure 30 : Réaction de réduction du NADP^+ au cours du dosage du glucose.

HK : Héxokinase

G-6-PDH : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

La concentration en fructose est déterminée par la soustraction de la concentration en glucose à la concentration en glucose/fructose. La concentration en glucose/fructose est déterminée à partir de la concentration en NADPH formé au cours des réactions enzymatiques de conversion du glucose-6-phosphate en gluconate-6-phosphate (Figure 31). Le fructose est phosphorylé par l'héxokinase ATP-dépendante en fructose-6-phosphate. Le fructose-6-phosphate est par la suite isomérisé en glucose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate isomérase. Le glucose-6-phosphate est ensuite oxydé en

gluconate-6-phosphate. Cette réaction est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Le NADP^+ est dans un même temps réduit en NADPH par cette même enzyme.

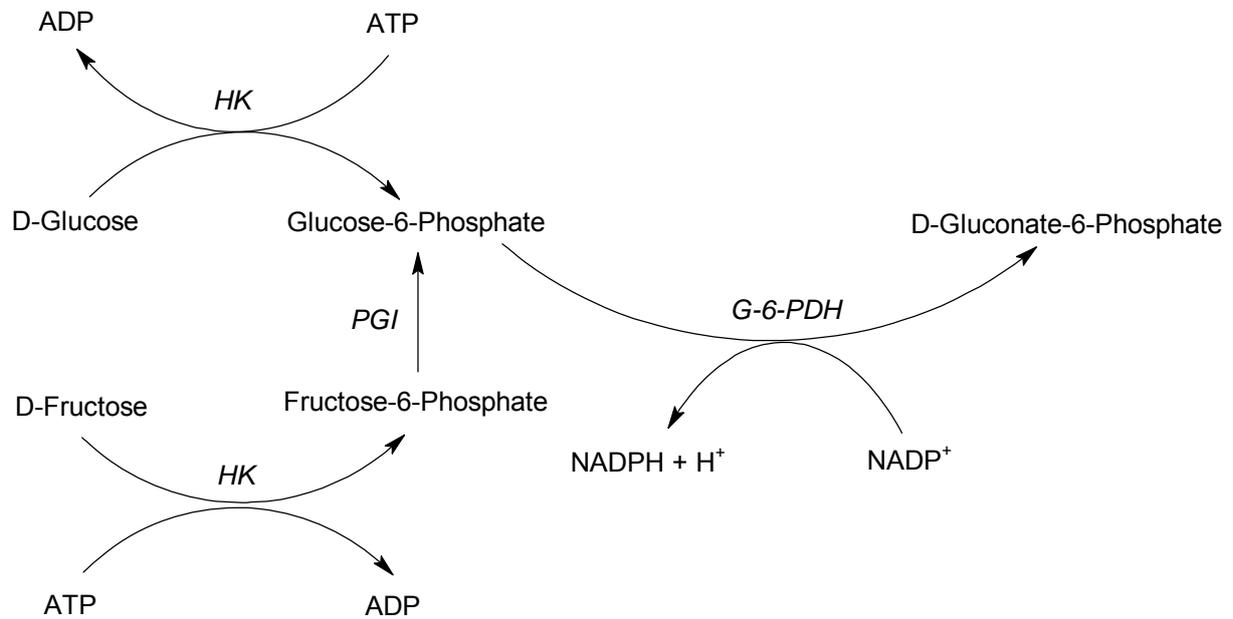


Figure 31 : Réaction de réduction du NADP^+ au cours du dosage du fructose

HK : Héxokinase

G-6-PDH : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

PGI : Glucose-6-phosphate isomérase

Le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose (Figure 32), le glucose et le fructose sont convertis en gluconate-6-phosphate selon les réactions enzymatiques présentées précédemment. La concentration en saccharose est déterminée à partir de la concentration de NADPH produits au cours de l'oxydation du glucose-6-phosphate en gluconate-6-phosphate.

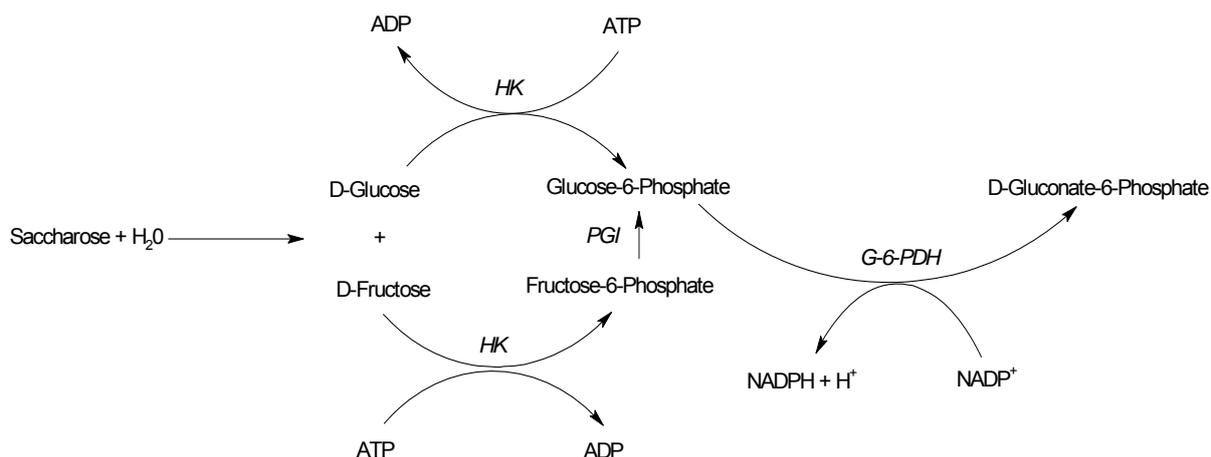


Figure 32 : Réaction de réduction du NADP⁺ au cours du dosage du saccharose

HK : Héxokinase

G-6-PDH : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

PGI : Glucose-6-phosphate isomérase

5.6.1.2 Extraction des sucres

200 mg de poudre d'épinards ou d'haricots verts ou bien des liquides de diffusion lyophilisés sont ajoutés à 1 ml d'eau milliQ, dans des tubes de type Eppendorf de 2 ml. Le tout est vortexé pendant 1 minute, puis centrifugé (modèle 1K15 ; Bioblock Scientific, Illkirch, France) à 7400 g pendant 10 minutes à 4°C.

Les surnageants issus des liquides de diffusion lyophilisés ont été dilués, les facteurs de dilution sont décrits dans le Tableau 30.

La codification des échantillons est précisée dans le Tableau 22 du paragraphe 4.3.

Tableau 30 : Dilutions appliquées au surnageant extrait pour le dosage des sucres dans les liquides de diffusion

Echantillon	Glucose	Glucose/Fructose	Saccharose
HV Lot 1.2. pH 5 25°C	1/10	1/10	1/20
HV Lot 1.2. pH 5 45°C	1/10	1/10	1/20
HV Lot 1.2. pH 5 65°C	1/10	1/10	1/20
EPI Lot 1.2. pH 5 25°C	∅	∅	∅
EPI Lot 1.2. pH 5 45°C	∅	∅	∅
EPI Lot 1.2. pH 5 65°C	∅	∅	∅
HV Lot 1.2.3. pH 7 45°C	1/10	1/10	1/20
HV Lot 1. pH 7 65°C	1/10	1/10	1/20
HV Lot 2.3. pH 7 65°C	1/20	1/20	1/40
EPI Lot 1.2.3. pH 7 25°C	1/2	1/2	1/2
EPI Lot 1.2.3. pH 7 45°C	1/2	1/2	1/2
EPI Lot 1.2.3. pH 7 65°C	1/2	1/2	1/2

∅ : pas de dilution faite pour l'échantillon.

Les surnageants issus des poudres de haricots verts des cinétiques de diffusion à t = 0 ; 10 ; 30 ; 60 ; 120 ; 180 et 240 minutes ont été dilués au 1/2, les surnageants issus des poudres d'épinards des cinétiques de diffusion à t = 0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 ; 60 ; 240 minutes n'ont pas été dilués.

5.6.1.3 Dosage par spectrophotométrie

5.6.1.3.1 Dosage du glucose

5 µl de surnageant dilué ou non (dilutions précisées dans le Tableau 30) sont déposés dans les puits de la microplaque. Le spectrophotomètre à microplaque est couplé à un système d'injection automatique. A t₀, 250 µl du réactif composé de 6 ml de solution A, 150 µl de solution B et 44 ml d'eau milliQ sont injectés dans le puits.

La composition des solutions A et B est décrite au paragraphe 1.3.1.

La mesure de la DO se fait à 340 nm pendant 10 minutes, jusqu'à l'atteinte du plateau, par pas de 1 minute. Avant chaque mesure de DO, la plaque est agitée. La concentration en glucose dans les échantillons est calculée à partir de la DO finale à 10 minutes à l'aide de la gamme étalon de glucose de 0 à 2 g.l⁻¹.

5.6.1.3.2 Dosage du fructose

5 µl de surnageant dilué ou non (dilutions précisées dans le Tableau 30) sont déposés dans les puits de la microplaque. Le spectrophotomètre à microplaque est couplé à un système d'injection automatique. A t₀, 250 µl du réactif composé de 3 ml de solution A, 75 µl de solution B, 75 µl de solution C et 25 ml d'eau milliQ sont injectés dans les puits.

La composition des solutions A, B et C est décrite dans le paragraphe 1.3.1.

La mesure de la DO se fait à 340 nm pendant 16 minutes, jusqu'à l'atteinte du plateau, par pas de 1 minute. Avant chaque mesure de DO, la plaque est agitée. La concentration en glucose/fructose dans les échantillons est calculée à partir de la DO finale à 16 minutes à l'aide de la gamme étalon de glucose/fructose (de 0 à 2 g.l⁻¹), obtenue par hydrolyse acide du D(+)-saccharose.

La concentration en fructose dans les échantillons est obtenue par soustraction de la concentration en glucose/fructose à la concentration en glucose.

5.6.1.3.3 Dosage du saccharose.

5 µl de surnageant dilué ou non (dilutions précisées dans le Tableau 30) sont déposés dans les puits de la microplaque, et 25 µl de solution de β-fructosidase (660 U/ml) sont ajoutés. Le tout est laissé sous agitation pendant 4 minutes. Le spectrophotomètre à microplaque est couplé à un système d'injection automatique. A t₀, 250 µl du réactif composé de 6 ml de solution A, 150 µl de solution B, et 44 ml d'eau milliQ sont injectés dans les puits de la microplaque.

La composition des solutions A et B est décrite dans le paragraphe 1.3.1.

La mesure de la DO se fait à 340 nm pendant 12 minutes (atteinte du plateau) par pas de 1 minute. Avant chaque mesure de DO, la plaque est agitée. La concentration en saccharose dans les échantillons est calculée à partir de la DO finale à 12 minutes à l'aide de la gamme étalon de saccharose de 0 à 4 g.l⁻¹.

5.6.2 Dosage des acides

5.6.2.1 Principe de la méthode

La concentration en acide citrique a été déterminée indirectement par dosage du NADH oxydé, au cours des réactions enzymatiques présentées dans la Figure 33, par spectrophotométrie à 340 nm. L'acide citrique ou citrate va être clivé par la citrate lyase ATP-dépendante. L'oxaloacétate et son produit de décarboxylation, le pyruvate, vont être réduits en malate et lactate respectivement. Ces deux réductions impliquent l'oxydation conjointe du NADH en NAD^+ , la concentration en NADH consommé au cours de ces réactions est dosé et permet de déterminer la concentration d'acide citrique initial.

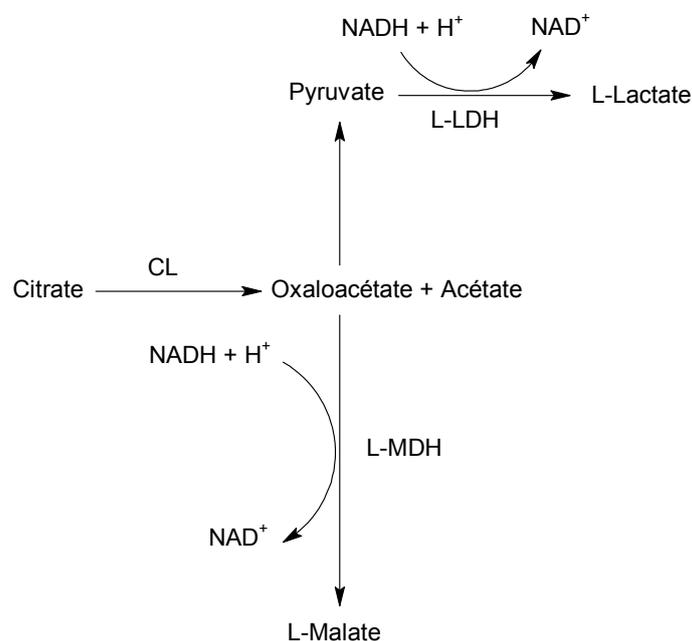


Figure 33 : Réaction d'oxydation du NADH lors du dosage de l'acide citrique

CL : Citrate lyase

L-LDH : Lactate déshydrogénase

L-LMH : Malate déshydrogénase

La concentration en acide malique est déterminée indirectement par dosage du NADH produit au cours de l'oxydation du malate en oxaloacétate (Figure 34) par la malate déshydrogénase, en spectrophotométrie à 340 nm. L'équilibre de la réaction d'oxydo-réduction catalysée par la L-malate déshydrogénase est plus favorable dans le sens de la réduction de l'oxaloacétate en malate, c'est pourquoi lors du dosage, l'oxaloacétate produit à partir du malate va être transformé en aspartate et oxoglutarate afin de maintenir le flux de la réaction dans le sens de l'oxydation.

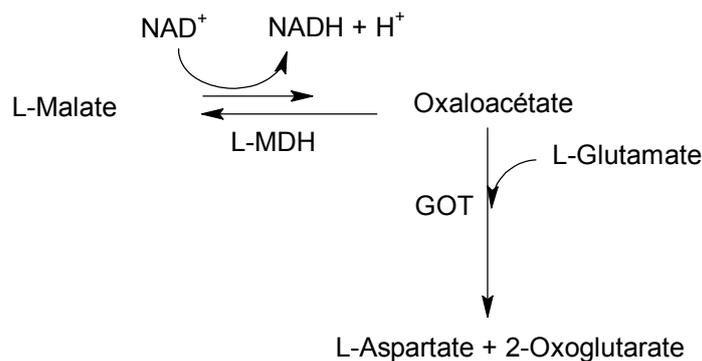


Figure 34 : Réaction d'oxydation du NADH lors du dosage de l'acide malique

L-MDH : Malate Déshydrogénase

GOT : Glutamate Oxaloacétate Transaminase

5.6.2.2 Extraction des acides

200 mg de poudre d'épinards ou de haricots verts ou bien des liquides de diffusion lyophilisés ont été ajoutés à 1 ml d'eau milliQ, dans des tubes de type Eppendorf de 2 ml. Le tout est vortexé pendant 1 minute, puis centrifugé (modèle 1K15 ; Bioblock Scientific, Illkirch, France) à 7400 g pendant 10 minutes à 4°C.

Les surnageants issus des liquides de diffusion lyophilisés ont été dilués, les facteurs de dilution sont décrits dans le Tableau 31 pour l'acide malique.

L'acide citrique n'a pas été dosé dans les liquides de diffusion lyophilisés correspondant aux expériences de diffusion à pH 5, du fait de la composition du tampon qui était un tampon citrate/phosphate.

Tableau 31: Dilutions appliquées au surnageant des extraits pour le dosage de l'acide malique

Echantillons	Dilution
HV Lot 1.2. pH 5 25°C	1/10
HV Lot 1.2. pH 5 45°C	1/10
HV Lot 1.2. pH 5 65°C	1/10
EPI Lot 1.2. pH 5 25°C	∅
EPI Lot 1.2. pH 5 45°C	∅
EPI Lot 1.2. pH 5 65°C	∅
HV Lot 1.2.3. pH 7 45°C	1/10
HV Lot 1.2.3. pH 7 65°C	1/10
EPI Lot 1.2.3. pH 7 25°C	∅
EPI Lot 1.2.3. pH 7 45°C	∅
EPI Lot 1.2.3. pH 7 65°C	∅

∅ : pas de dilution faite pour l'échantillon.

5.6.2.3 Dosage de l'acide citrique.

5 µl de surnageant dilué ou non (dilutions précisées dans le Tableau 31) sont déposés dans les puits de la microplaque. 170 µl de solution A sont ajoutés à la pipette automatique. La plaque est agitée. Le spectrofluorimètre à microplaque (Xenius, Safas, Monaco) est couplé à un système d'injection automatique (Injenius 6009, Safas, Monaco). L'injecteur à $t=5 \text{ min}$ va injecter dans les puits 135 µl de solution B.

La composition des solutions A et B est précisée au paragraphe 1.3.2.

La mesure de la DO se fait à 340 nm pendant 16 minutes (atteinte du plateau) par pas de 1 minute. Avant chaque mesure de DO, la plaque est agitée. La concentration en acide citrique dans les échantillons est calculée à partir de la DO finale à 16 minutes à l'aide de la gamme étalon d'acide citrique de 0 à 1 g.l⁻¹.

5.6.2.4 Dosage de l'acide malique

5 µl de surnageant dilué ou non (dilutions précisées dans le Tableau 31) sont déposés dans le puits de la microplaque. A $t=0$, 250 µl de solution A sont ajoutés. La mesure de la DO se fait à 340 nm pendant 6 minutes (attente du plateau) par pas de 1 minute. Avant chaque mesure de DO, la plaque est agitée. La concentration en acide malique dans les échantillons est calculée à partir de la DO finale à 6 minutes à l'aide de la gamme étalon d'acide malique de 0 à 1 g.l⁻¹.

La composition des solutions A et B est précisée au paragraphe 1.3.2.

5.7 Détermination de la matière sèche (MS)

3 g de broyat d'échantillon décongelés sont déposés dans une nacelle, préalablement séchée pendant 2 h à 70 °C et refroidie au dessiccateur. La nacelle puis la nacelle et l'échantillon sont pesés avant d'être mis à l'étuve à 70 °C pendant 4 jours. Après 4 jours de séchage, la nacelle est sortie de l'étuve et placée à refroidir dans un dessiccateur, puis la teneur en matière sèche est déterminée par l'Equation 3.

$$MS = \frac{(m_{nacelle} + m_{ech})i - (m_{nacelle})}{(m_{nacelle} + m_{ech})f - (m_{nacelle})}$$

Équation 3

6. Analyse statistique

6.1 Impact des procédés industriels sur les teneurs en folates

Les résultats sont présentés par la moyenne de triplicats de matière végétale, et la reproductibilité des résultats est exprimée par l'écart-type global des données, pour les folates totaux contenus dans les épinards. L'écart-type global a été calculé d'après l'Equation 4 (Taylor, 1987).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum \text{var}}{DDL}}$$

Équation 4

Où var est la variance de chaque série de réplicats et DDL le nombre de degré de liberté.

Pour les résultats des folates totaux dans les haricots verts, les résultats sont présentés par la moyenne de triplicats et la reproductibilité est exprimée par l'écart type.

Le test de Student a été calculé sur les répétitions des données biochimiques (pour les épinards et les haricots verts). Le premier test de Student a comparé les moyennes de 3 lots d'épinards avec 3 réplicats de prélèvement, avec 5 modalités à partir de la valeur de la « matière première » (Avant lavage ; Après lavage ; Après blanchiment et Produit fini).

Le second test de Student a consisté en la comparaison des moyennes de 5 lots d'haricots verts de 3 réplicats de prélèvement, pour 5 modalités à partir de la "matière première" (Matière première, Avant blanchiment ; Après blanchiment ; Après ajout du liquide de recouvrement et Produit final). Les tests de Student ont été réalisés pour déterminer les différences significatives entre les différentes conditions, ils ont été calculés à l'aide du logiciel XLSTAT© (Microsoft). Une p -value $< 0,05$ a été considérée comme significative.

6.2 Impact des cuissons domestiques sur les teneurs en folates, acide ascorbique et lutéine

Les résultats sont présentés par la moyenne de duplicats analytiques, et la reproductibilité des résultats est exprimée par l'écart-type global des données, pour les folates totaux contenus dans les échantillons. L'écart-type global a été calculé d'après l'Equation 4 (Taylor, 1987).

Le test de Student a été calculé sur les répétitions des données biochimiques (pour les épinards et les haricots verts). Le premier test de Student a comparé les moyennes de 3 lots avec 2 valeurs, avec 3 modalités à partir de la valeur du produit frais (cru ; après cuisson au cuit vapeur et après cuisson dans de l'eau à ébullition), pour chaque micronutriment (folates, vitamine C et lutéine).

Le second test de Student a comparé les moyennes de 3 lots de 2 valeurs, avec 2 modalités à partir de la valeur du produit surgelé (cru et après cuisson dans de l'eau à ébullition), pour chaque micronutriment (folates, vitamine C et lutéine). Les tests de Student ont été réalisés pour déterminer les différences significatives entre les différentes conditions, ils ont été calculés à l'aide du logiciel XLSTAT© (Microsoft office). Une p -value $< 0,05$ a été considérée comme significative.

Chapitre 4 :

Impact des procédés de transformation industriels et domestiques

1. Impact des procédés de transformation : industriels et domestiques

Différents procédés de transformation ont été étudiés, tant industriels que domestiques.

Les procédés industriels de surgélation des épinards et d'appertisation des haricots verts comportent des étapes similaires, comme l'étape de lavage et l'étape de blanchiment. Dans les deux procédés, l'étape de blanchiment est précédée de l'étape de lavage. Cependant, les temps de lavage et de blanchiment diffèrent. Le lavage des épinards a une durée de 30 secondes à 1 minute alors que le lavage des haricots verts a une durée de 1 à 3 minutes. Le blanchiment des épinards a été fait à l'aide de blancheurs à aspersion pendant 70 à 120 secondes, celui des haricots verts par des blancheurs à aspersion ou à immersion pendant 1 à 4 minutes. La température de l'eau de blanchiment est similaire (90 à 95 °C pour les épinards ; 85 à 95 °C pour les haricots verts). Par contre, les deux procédés présentent des étapes spécifiques telles que la surgélation (température appliquée de -30 à -18 °C pendant 30 à 60 minutes) pour les épinards et la stérilisation (température appliquée de 125 à 130 °C pendant 6 à 15 minutes) pour les haricots verts.

L'impact des cuissons domestiques des épinards et des haricots verts sur la dégradation des folates a été étudié à partir de matériel végétal frais, surgelé ou en conserve. Différents modes de cuisson ont été utilisés avec des temps et des rapports solides liquides différents entre haricots verts et épinards. Les épinards et les haricots verts frais ont été cuits dans de l'eau à ébullition pendant 8 minutes. Le rapport solide-liquide utilisé lors de la cuisson est plus élevé pour les haricots verts (ratio : 1 g / 2 ml) que pour les épinards (ratio : 1 g / 4 ml). La cuisson à la vapeur a été faite à partir de 200 g d'épinards et 300 g de haricots verts frais. La cuisson dans de l'eau à ébullition des légumes surgelés a été effectuée pendant 15 minutes pour les épinards et 13 minutes pour les haricots verts avec un rapport solide/liquide de 1 g pour 2 ml d'eau.

La concentration en folates dans les échantillons prélevés le long des deux chaînes de transformations industrielles et des échantillons issus des cuissons domestiques a été déterminée par HPLC avec une détection en fluorimétrie après transformation chimique. La concentration des différents dérivés de folates a été déterminée par dilution d'isotope stable et une détection en spectrométrie de masse, pour les échantillons de haricots verts et d'épinards prélevés sur les chaînes industrielles. Les résultats obtenus sont exprimés en mg.kg^{-1} de matière fraîche (MF) en équivalent acide folique.

1.1 Evolution de la matière sèche au cours des procédés de transformation

1.1.1 Procédés industriels

1.1.1.1 Surgélation des épinards

La teneur en matière sèche (Tableau 32) n'est pas statistiquement différente entre la matière première et le produit fini pour l'ensemble des trois lots d'épinards. Cependant, elle varie de façon significative au cours du procédé industriel. L'étape de lavage induit une diminution de 26 % de la matière sèche pour l'ensemble des trois lots. La matière sèche dans les épinards avant et après blanchiment n'est pas statistiquement différente, hormis pour le lot B où la matière sèche augmente de 18 %. L'étape de congélation aboutit à une perte en eau d'où une augmentation de la matière sèche.

Tableau 32 : Evolution de la matière sèche des épinards au cours du procédé de transformation pour les trois lots prélevés

	<i>Moyenne</i>	Lot A	Lot B	Lot C
Matière première	$0,081 \pm 0,006$	$0,085 \pm 0,004$	$0,077 \pm 0,001$	\emptyset
Avant lavage	$0,086 \pm 0,009$	$0,079 \pm 0,006$	\emptyset	$0,092 \pm 0,003$
Après lavage	$0,060 \pm 0,002$	$0,061 \pm 0,003$	$0,058 \pm 0,004$	$0,061 \pm 0,006$
Après blanchiment	$0,068 \pm 0,001$	$0,067 \pm 0,009$	$0,069 \pm 0,0005$	$0,069 \pm 0,004$
Produit fini	$0,089 \pm 0,005$	$0,083 \pm 0,001$	$0,092 \pm 0,001$	$0,092 \pm 0,002$

\emptyset : non prélevé

1.1.1.2 Appertisation des haricots verts

Contrairement aux épinards, il n'y a pas de variation de la matière sèche au cours du procédé, notamment, il n'y a pas de diminution lors de l'étape de blanchiment. Entre la matière première et le produit fini, la matière sèche diminue significativement seulement pour les lots B et C (Tableau 33). L'analyse statistique montre que la matière sèche n'évolue pas lors de l'étape de blanchiment pour les 5 lots étudiés.

Tableau 33 : Evolution de la matière sèche au cours du procédé de transformation des haricots verts pour les 5 lots prélevés

	Moyenne	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E
Matière première	$0,095 \pm 0,001$	$0,094 \pm 0,008$	$0,094 \pm 0,001$	$0,094 \pm 0,001$	$0,096 \pm 0,001$	∅
Avant blanchiment	$0,094 \pm 0,007$	$0,090 \pm 0,005$	$0,089 \pm 0,003$	$0,097 \pm 0,001$	$0,091 \pm 0,017$	$0,105 \pm 0,006$
Après blanchiment	$0,098 \pm 0,007$	Aspersion $0,096 \pm 0,001$	Immersion $0,088 \pm 0,001$	Aspersion $0,102 \pm 0,003$	Immersion $0,108 \pm 0,004$	Immersion $0,098 \pm 0,006$
Avant jutage	$0,101 \pm 0,001$	$0,102 \pm 0,002$	∅	$0,100 \pm 0,003$	∅	∅
Produit fini	$0,087 \pm 0,004$	$0,086 \pm 0,005$	$0,083 \pm 0,003$	$0,085 \pm 0,005$	$0,089 \pm 0,003$	$0,092 \pm 0,004$

1.1.1.3 Cuisson domestique des épinards

La cuisson dans de l'eau à ébullition des épinards frais et surgelés induit une diminution significative de la matière sèche tandis que la cuisson à la vapeur entraîne une augmentation significative de la matière sèche (Tableau 34).

Tableau 34 : Evolution de la matière sèche dans les épinards au cours des traitements domestiques

		Moyenne	Lot F	Lot G	Lot H
Frais	Cru	$0,095 \pm 0,005$	$0,100 \pm 0,006$	$0,092 \pm 0,001$	$0,092 \pm 0,003$
	Cuisson eau ébullition	$0,073 \pm 0,002$	$0,074 \pm 0,005$	$0,074 \pm 0,001$	$0,070 \pm 0,001$
	Cuisson vapeur	$0,104 \pm 0,006$	$0,111 \pm 0,003$	$0,100 \pm 0,001$	$0,100 \pm 0,002$
Surgelés			Lot I	Lot J	Lot K
	Cru	$0,095 \pm 0,012$	$0,081 \pm 0,004$	$0,101 \pm 0,002$	$0,102 \pm 0,004$
	Cuisson eau ébullition	$0,078 \pm 0,007$	$0,071 \pm 0,002$	$0,079 \pm 0,002$	$0,084 \pm 0,002$
Conserve			Lot L	Lot M	Lot N
		$0,104 \pm 0,018$	$0,125 \pm 0,007$	$0,094 \pm 0,0002$	$0,094 \pm 0,003$

1.1.1.4 Cuisson domestique des haricots verts

L'analyse statistique ne montre pas de différences significatives de la matière sèche des haricots verts frais après cuisson dans de l'eau à ébullition et à la vapeur.

La matière sèche des haricots verts surgelés est inférieure après cuisson (Tableau 35).

Tableau 35 : Evolution de la matière sèche dans les haricots verts au cours des traitements domestiques

		<i>Moyenne</i>	Lot O	Lot P	Lot Q
Frais	Cru	$0,090 \pm 0,023$	0,116 \pm 0,033	0,077 \pm 0,0006	0,076 \pm 0,0002
	Cuisson eau ébullition	$0,090 \pm 0,025$	0,119 \pm 0,0002	0,076 \pm 0,0002	0,076 \pm 0,0004
	Cuisson vapeur	$0,088 \pm 0,021$	0,112 \pm 0,007	0,076 \pm 0,0002	0,077 \pm 0,001
			Lot R	Lot S	Lot T
Surgelés	Cru	$0,121 \pm 0,007$	0,113 \pm 0,004	0,122 \pm 0,001	0,127 \pm 0,0005
	Cuisson eau ébullition	$0,108 \pm 0,013$	0,094 \pm 0,003	0,109 \pm 0,003	0,120 \pm 0,001
			Lot U	Lot V	Lot W
Conserve		$0,097 \pm 0,002$	0,099 \pm 0,004	0,096 \pm 0,0002	0,097 \pm 0,001

1.2 Variabilité des matières premières

1.2.1 Epinards

Trois lots d'épinards ont été prélevés le long de la chaîne de transformation, de leur arrivée à l'usine, jusqu'au produit fini. Pour deux des trois lots, la matière première a été prélevée à son arrivée à l'usine et analysée. La Figure 35A présente les teneurs en folates des lots A et B. Ces concentrations diffèrent d'environ 1/4 et ce de façon statistiquement significative ($p < 0,05$).

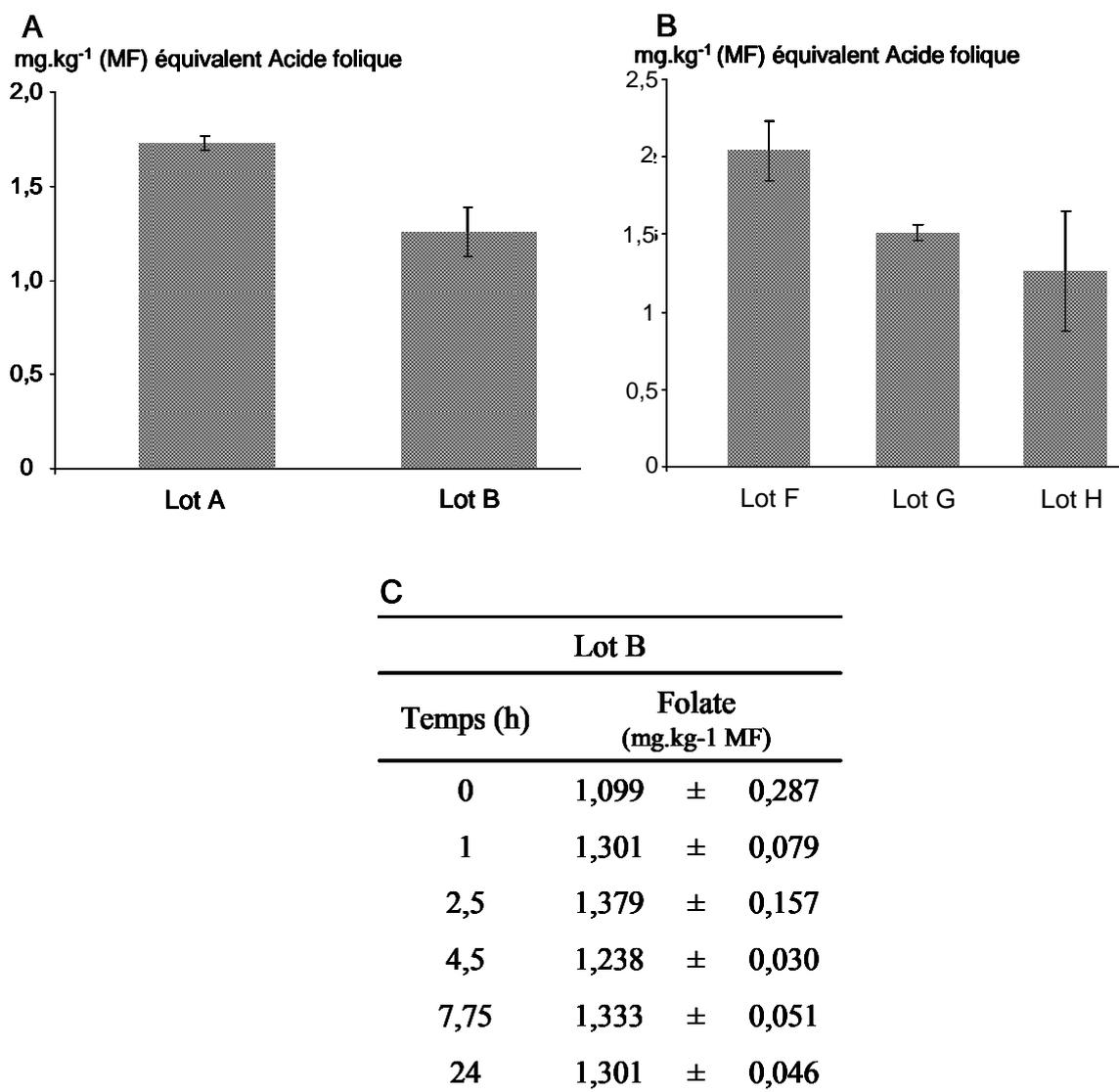


Figure 35 : Variabilité de la matière première d'épinards.

A : Variabilité intra lot des épinards dans le procédé industriel ; B : Variabilité intra lot épinards dans le procédé domestique ; C : Variabilité de la matière première du lot B suivie sur 24 heures

La concentration en folates dans les épinards frais utilisés dans le procédé domestique (Figure 35B) ne montre pas de différence significative entre les trois lots F, G et H, cependant les écart-types sont plus élevés que les produits industriels pour les lots F et H.

Les teneurs en folates d'un même lot (lot B), après récolte, ont été suivies sur 24 heures (figure 35C). La teneur en folates dans la matière première ne varie pas au cours du stockage à l'usine, c'est-à-dire à température ambiante d'environ 20 °C, à l'air, pendant 24 heures.

1.2.2 Haricots verts

En ce qui concerne les prélèvements sur le site industriel, il n'y a pas de différences significatives entre les lots A et B ainsi qu'entre les lots B et C. En revanche, la concentration en folates dans la matière première du lot A est significativement plus faible que celle du lot C (Figure 36A).

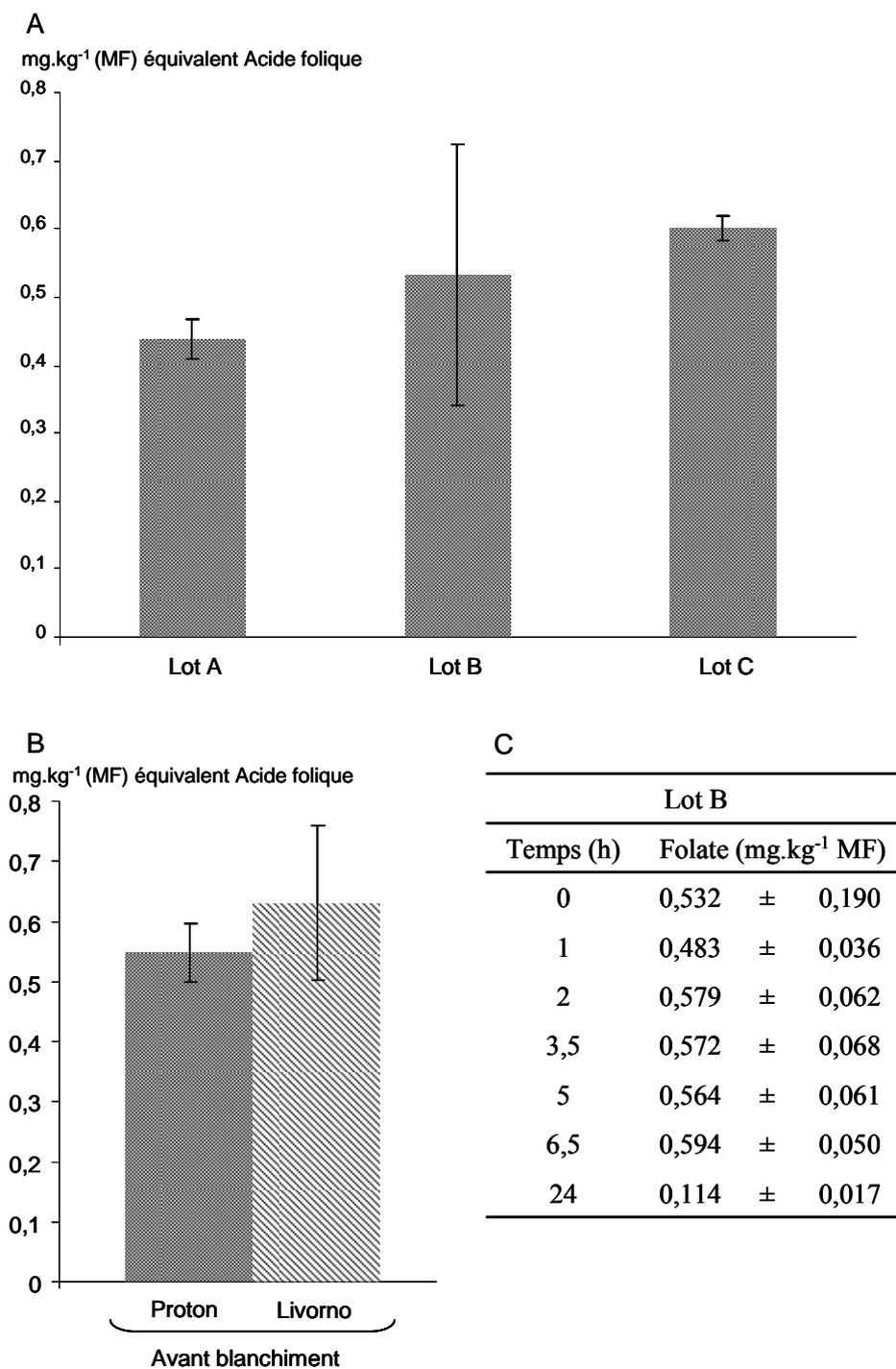


Figure 36 : Variabilité des folates dans la matière première de haricots verts

A : Variabilité de la matière première intra-lots ; B : Variabilité de la matière première inter-cultivar ; C : variabilité de la teneur en folates dans la matière première du lot B suivie sur 24 heures

La matière première du lot E (cultivar Livorno) n'a pas pu être échantillonnée à son arrivée à l'usine. Il n'y a pas de différences significatives dans la concentration en folates du cultivar Livorno et du cultivar Proton, avant le blanchiment (Figure 36 B).

Le suivi sur 24 heures de la teneur en folates de la matière première du lot B (figure 36C) ne montre pas de différences significatives dans les 6,5 premières heures. Par contre, la teneur en folates baisse très significativement après 24 heures.

Dans le procédé domestique (Figure 37), la concentration en folates dans les haricots verts frais ne varie pas significativement entre les trois lots O, P et Q. Les concentrations en folates des haricots verts frais utilisés dans le procédé domestique sont similaires aux concentrations en folates dans les haricots verts utilisés dans le procédé industriel.

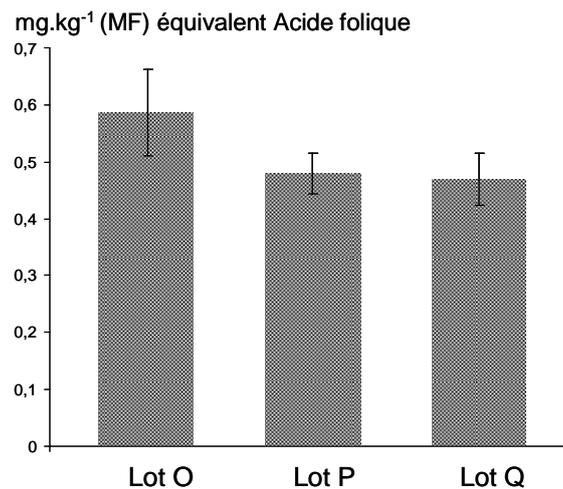


Figure 37 : Variabilité des haricots verts frais au cours des traitements domestiques

Globalement, les teneurs en folate semblent stables dans les matières premières (épinards et haricots verts), le rapport entre les concentrations les plus faibles et les plus élevées étant inférieur à 2.

1.2.3 Evolution de la teneur en folates au cours du procédé de surgélation des épinards

Les concentrations en folates au cours du procédé de surgélation des épinards sont présentées dans la Figure 38 (résultats en matière fraîche présentés en Figure 38A et résultats en matière

sèche présentés en Figure 38B). Ces résultats correspondent à la moyenne des concentrations des trois lots indépendants suivis au cours du procédé.

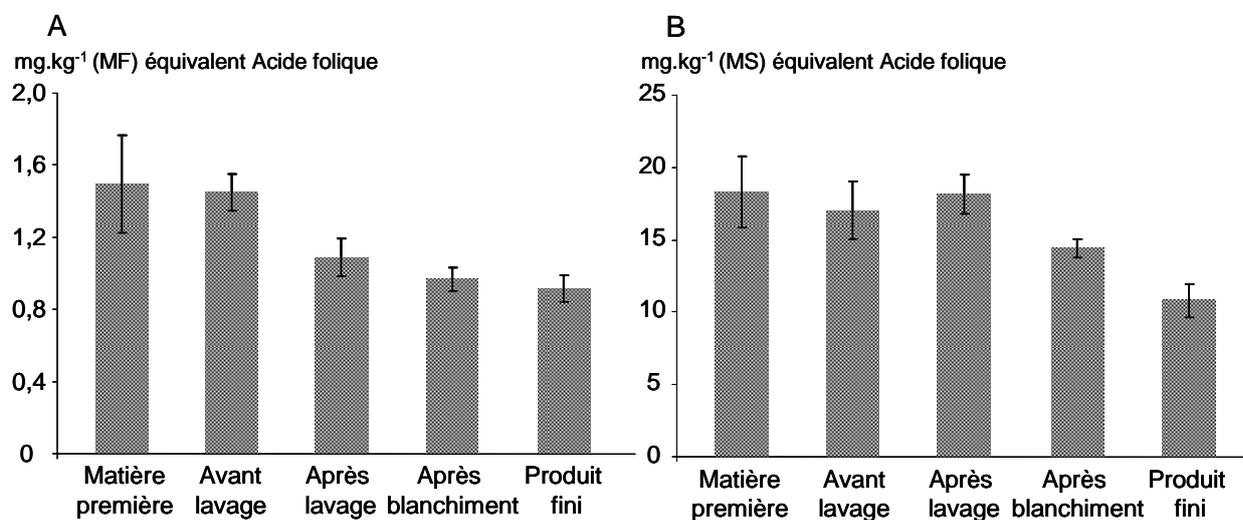


Figure 38 : Evolution de la teneur en folate dans les épinards au cours du procédé de transformation

La concentration moyenne en folates dans la matière première à leur arrivée à l'usine est de $1,49 \pm 0,27$ mg.kg⁻¹ (MF) (moyenne obtenue sur deux lots seulement). Après l'étape de surgélation, la concentration en folates est de $0,92 \pm 0,07$ mg.kg⁻¹ (MF). Le procédé de surgélation induit une diminution de la concentration en folates dans les épinards de 38 % par rapport à la matière fraîche et de 41 % par rapport à la matière sèche.

L'étape de lavage induit une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration en folates (de 25 %) exprimée en matière fraîche. Dans un même temps, la matière sèche des échantillons prélevés avant et après l'étape de lavage est de 0,085 g/g et de 0,059 g/g respectivement. Cette diminution de la matière sèche de 30 % est concomitante à une perte ou une dilution de molécules solubles, dont les folates font partie. La concentration en folates après l'étape de blanchiment, de $0,97 \pm 0,06$ mg.kg⁻¹ exprimée en matière fraîche, n'est pas statistiquement diminuée. Cependant, la concentration exprimée en matière sèche montre une diminution significative au cours du blanchiment de l'ordre de 20 %, alors que la matière sèche n'évolue pas au cours de cette étape. La concentration en folates dans le produit surgelé est de $0,92 \pm 0,07$ mg.kg⁻¹ exprimée en matière fraîche, celle-ci n'est pas statistiquement différente de la concentration en folates dans les épinards blanchis. En revanche, celle-ci est statistiquement diminuée lorsqu'elle est exprimée en matière sèche (diminution de 25 %). La

concentration en folates exprimée en matière fraîche dans les épinards surgelés est statistiquement différente ($p < 0,05$) de la concentration en folates dans les épinards après l'étape de lavage avec une diminution de 15 %. L'évolution des concentrations en folates au cours du procédé industriel est différente selon qu'elle est exprimée en matière fraîche (diminution à l'étape de lavage) ou en matière sèche (diminution à l'étape de blanchiment et de surgélation). Ceci est à rapprocher des évolutions marquées de la teneur en matière sèche (paragraphe 1.1.1.1.).

La concentration moyenne en folates dans les épinards surgelés achetés au supermarché pour le procédé domestique est de $1,24 \pm 0,16 \text{ mg.kg}^{-1}$ (pour les trois lots), proche de celle mesurée dans les épinards surgelés prélevés à l'usine.

1.2.4 Impact du procédé de transformation sur la teneur des différents dérivés

Les deux dérivés majeurs présents dans les épinards à la fois dans la matière première et le produit fini sont le 5-CH₃-H₄folate et le 5-HCO-H₄folate. Le 5-CH₃-H₄folate représente 42 % des folates totaux dans la matière première et 59 % dans le produit fini. Le 5-HCO-H₄folate représente 30 % des folates totaux dans la matière première et 13 % dans le produit fini.

Les composés minoritaires sont le 10-HCO-PteGlu (10,9 % dans la matière première et 4,8 % dans le produit fini), le H₄folate (4,5 et 7,3 %), l'acide folique (PteGlu) (4,8 et 13 %) le 5,10-CH⁺-H₄folate (1,6 et 1,4%) et le 10-HCO-H₂folate (7,4 et 0,7%).

1.2.4.1 Impact du procédé de transformation sur les dérivés majoritaires

La concentration du 5-CH₃-H₄folate (Figure 39A) ne diminue pas de façon statistiquement significative au cours du procédé. Le suivi par étape montre cependant des évolutions avec une augmentation avant l'étape de lavage et une diminution significative entre ce point de prélèvement et après le blanchiment.

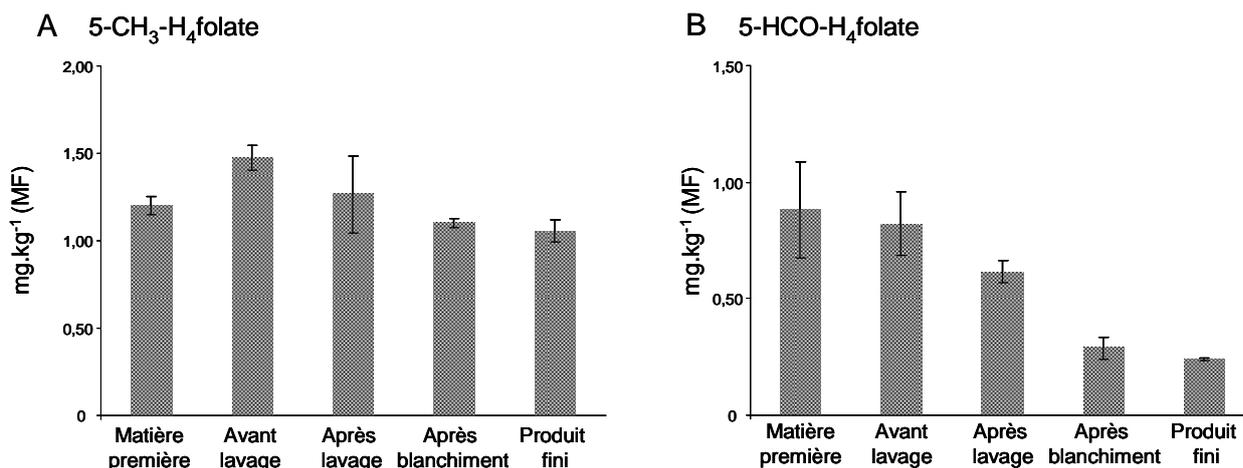


Figure 39 : Evolution de la concentration des dérivés de folates au cours du procédé

A : Evolution de la concentration du 5-CH₃-H₄folate ; B : Evolution de la concentration en 5-HCO-H₄folate

Par contre, la concentration en 5-HCO-H₄folate (Figure 39B) diminue de près de 3/4 entre la matière première et le produit fini, cette diminution ayant surtout lieu pendant le lavage et le blanchiment. Enfin, la surgélation n'induit pas de perte significative du 5-HCO-H₄folate.

1.2.4.2 Impact du procédé de transformation sur les dérivés minoritaires

Les concentrations des composés minoritaires montrent des évolutions contrastées au cours du procédé. Pour deux d'entre eux, le H₄folate (Figure 40B) et l'acide folique (PteGlu) (Figure 40C), la concentration augmente significativement, après le lavage pour le H₄folate et après le blanchiment pour le PteGlu.

Pour le 10-HCO-PteGlu (Figure 40A) et le 10-HCO-H₂folate (Figure 40E), l'écart-type très élevé sur les concentrations dans la matière première empêche de tirer des conclusions statistiquement significatives entre la matière première et le produit fini. Cependant, l'évolution entre l'étape « avant lavage » et « produit fini » montre une diminution des concentrations.

Enfin, pour le 5,10-CH⁺-H₄folate (Figure 40D), il n'y a pas de différence sensible, sauf une augmentation marquée à l'étape « avant lavage ».

L'évolution observée des concentrations en folates totaux reflète surtout la perte observée en 5-HCO-H₄folate dans les épinards, il est donc possible de différencier des dérivés relativement stables (5-CH₃-H₄folate, H₄folate et PteGlu) de ceux qui semblent être plus fragiles, notamment les dérivés porteurs d'un groupement formyle (HCO).

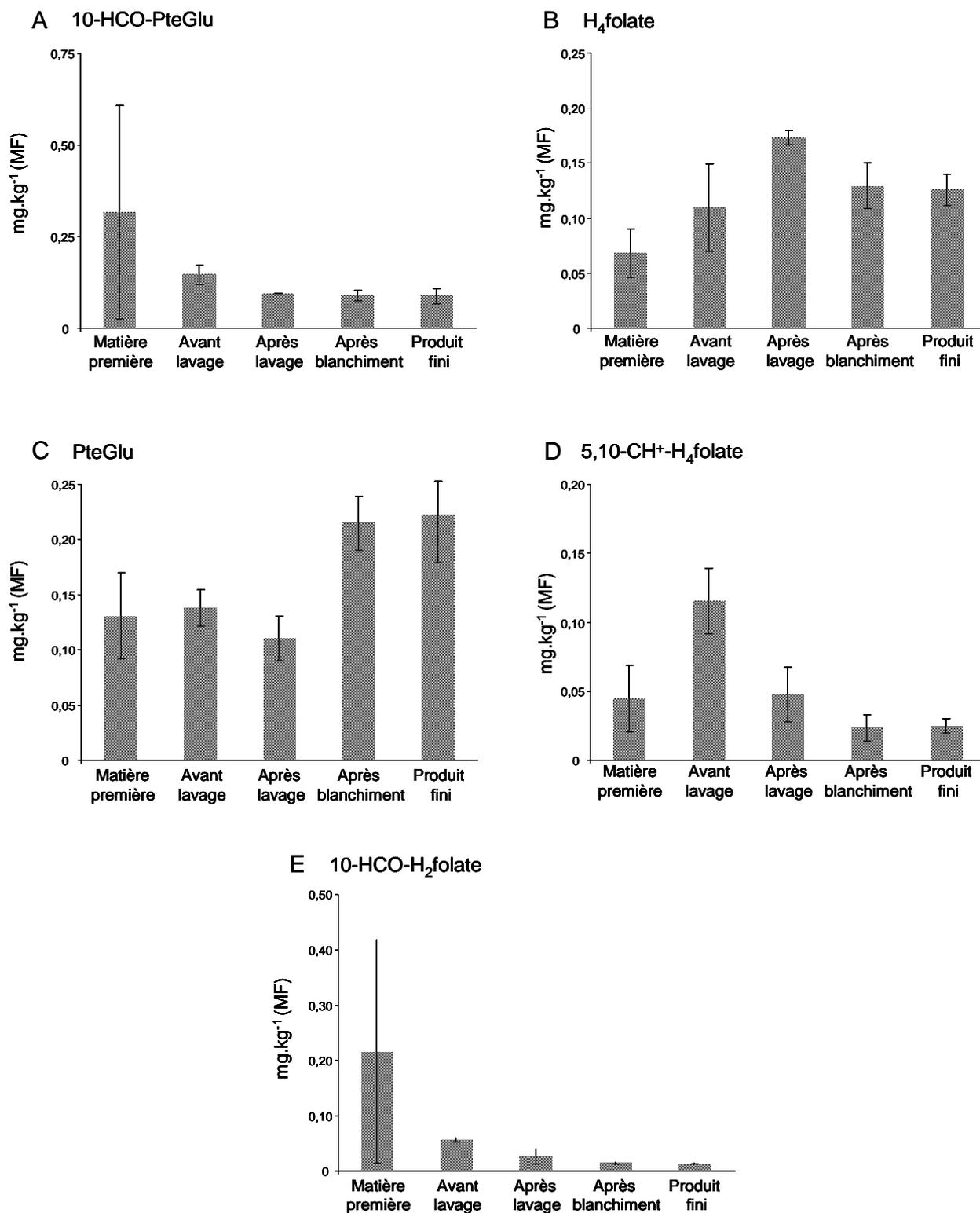


Figure 40 : Evolution de la concentration des dérivés de folates minoritaires au cours du procédé de transformation

A : Evolution de la concentration du 10-HCO-PteGlu ; B : Evolution de la concentration du H₄-folate ; C : Evolution de la concentration du PteGlu ; D : Evolution de la concentration du 5,10CH⁺-H₄-folate ; E : Evolution de la concentration du 10-HCO-H₂-folate

1.2.5 Impact des traitements domestiques

Les cuissons domestiques ont été effectuées à partir d'épinards frais ou surgelés soit dans de l'eau à ébullition soit par cuisson à la vapeur. La teneur en folates a été déterminée dans les légumes cuits et dans les liquides de cuisson. La concentration en folates a aussi été déterminée dans les épinards de boîtes de conserve et dans le liquide de recouvrement correspondant.

Outre les folates, deux autres microconstituants, la vitamine C et la lutéine, ont été suivis.

1.2.5.1 Teneur en folates

La concentration en folates totaux dans les épinards (Figure 41) frais crus est de $1,67 \pm 0,41$ mg.kg⁻¹ (MF) et diminue significativement à $0,89 \pm 0,34$ mg.kg⁻¹ (MF) après cuisson. Il a été possible de récupérer les liquides de cuisson et donc de faire un bilan massique. La concentration en folates dans le liquide de cuisson est de $0,23 \pm 0,11$ mg.l⁻¹. La perte par lessivage des folates dans les liquides de cuisson représente 25 %, la perte nette est de 23 %. La concentration en folates dans les épinards après cuisson à la vapeur est de $1,6 \pm 0,33$ mg.kg⁻¹ (MF), la cuisson à la vapeur n'induit pas de perte en folates.

La concentration en folates dans les épinards surgelés (Figure 41) est de $1,22 \pm 0,16$ mg.kg⁻¹ (MF) et diminue significativement après cuisson dans l'eau bouillante. La concentration est un peu plus élevée (≈ 50 %) que celle observée dans les épinards surgelés issus des lignes de production industrielle, probablement à cause d'une matière première différente. La concentration dans les épinards cuits est de $0,49 \pm 0,21$ mg.kg⁻¹ (MF) et dans les liquides de cuisson de $0,41 \pm 0,13$ mg.l⁻¹. La perte est de 50 %, due à un phénomène de lessivage des folates vers le liquide de cuisson. Ce lessivage a été plus marqué qu'à partir du produit frais malgré un rapport solide/liquide plus faible.

Enfin, la concentration en folates déterminée dans les légumes en conserve (Figure 41) est de $0,73 \pm 0,34$ mg.kg⁻¹ (MF), La concentration en folates dans le liquide de recouvrement est de $0,69 \pm 0,31$ mg.l⁻¹. La concentration en folates dans les légumes est en équilibre avec la concentration en folates mesurée dans le liquide de recouvrement.

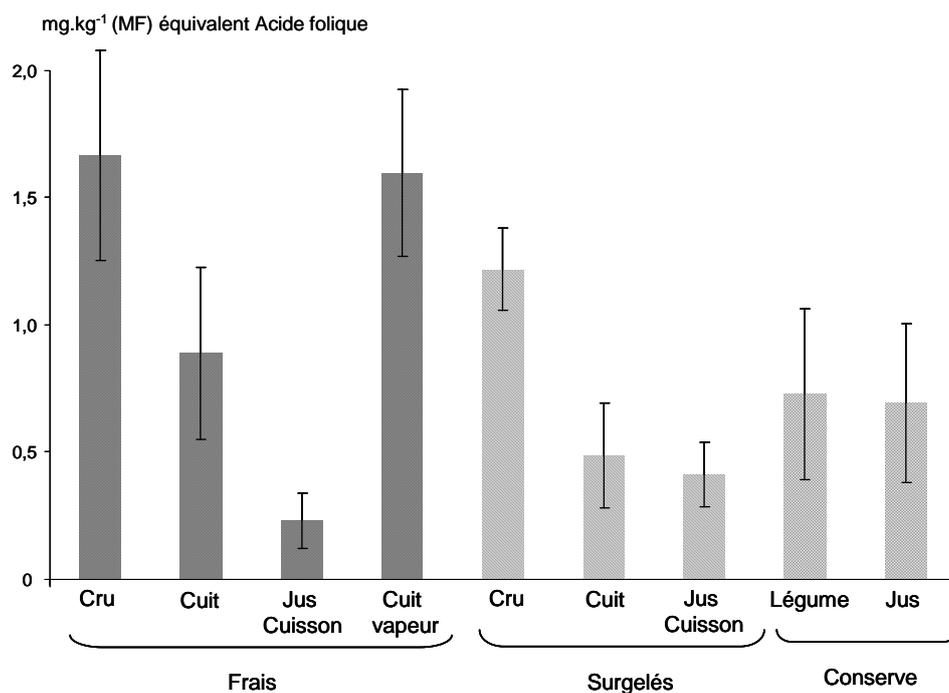


Figure 41 : Concentration en folates dans les épinards (crus et cuits) et dans les liquides de cuisson

1.2.5.2 Vitamine C et lutéine

La concentration en lutéine dans les épinards (Figure 42A) ne diminue pas au cours des traitements domestiques. Elle a même tendance à augmenter, ceci pourrait s'expliquer par la nature lipophile de la lutéine qui serait retenue dans les matrices végétales.

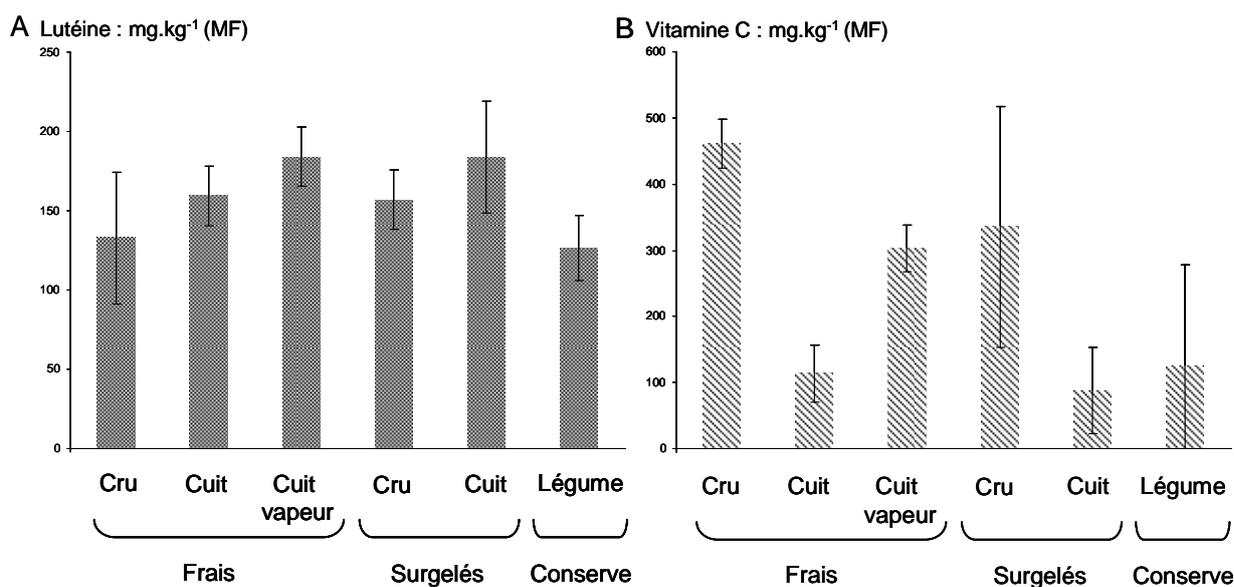


Figure 42 : Concentration en lutéine et vitamine C dans les épinards crus et après cuisson

La concentration en vitamine C totale est par contre affectée par ces mêmes traitements (Figure 42B). Elle diminue significativement, de près de 3/4, lors d'une cuisson dans de l'eau à ébullition des épinards frais ou surgelés. La concentration en vitamine C diminue aussi, d'environ 1/3, lors de la cuisson à la vapeur des épinards frais. Les concentrations dans les épinards en conserve sont très hétérogènes, de 22 mg.kg⁻¹ à 325 mg.kg⁻¹ par rapport à la matière fraîche.

Des trois molécules suivies, seule la concentration en vitamine C diminue significativement lors de la cuisson à la vapeur. Pour les folates, il semblerait donc que la perte au cours de ces procédés soit fortement liée à la présence d'eau, et non exclusivement au traitement thermique lui-même.

1.3 Impact de l'appertisation sur la teneur en folates dans les haricots verts

Cinq lots de haricots verts ont été suivis le long du procédé d'appertisation. Deux modes de blanchiment ont été utilisés, aspersion ou immersion. Les haricots verts étaient soit coupés soit non coupés. Enfin, les haricots verts ont été mis dans trois types de boîtes, 1/4, 1/2 et 4/4 (voir Tableau 17, paragraphe 2.1.2. Chapitre Matériel et Méthodes).

Les concentrations en folates présentées dans ce paragraphe sont la moyenne globale des cinq lots pour les résultats concernant l'impact de chaque étape du procédé.

L'impact du mode de blanchiment a été montré en comparant la moyenne de deux lots pour le blanchiment par aspersion avec celle de trois lots pour le blanchiment par immersion.

L'impact de la nature des haricots verts (coupés ou non coupés) a été étudié en comparant la moyenne de trois lots pour les haricots verts coupés et deux lots pour les haricots verts non coupés.

Enfin, l'effet de la taille de la boîte sur la concentration en folates a été déterminé en comparant la moyenne de deux lots pour les boîtes 1/4, deux lots pour les boîtes 4/4 et la concentration d'un lot pour les boîtes 1/2.

1.3.1 Impact du procédé industriel sur les folates totaux

Les concentrations en folates totaux dans les échantillons de haricots verts le long de la chaîne industrielle de transformation sont présentées dans la Figure 43A. L'ensemble du procédé d'appertisation induit une diminution significative de la concentration, d'environ 30 %. Le bilan matière dans la boîte indique une répartition des folates pour 70 % dans les haricots verts et 20 % dans les liquides de recouvrement. Si ces concentrations sont ramenées à la quantité de haricots verts présents, la perte nette en folates est de 10 %, pour une perte par diffusion vers les liquides de recouvrement de 20 % et ce juste à la sortie de chaîne d'appertisation.

La concentration en folates par rapport à la matière fraîche ne varie pas statistiquement entre la matière première et l'étape « après blanchiment ». Par rapport à la matière sèche (Figure 43B), la concentration en folates ne varie pas de façon statistiquement significative tout au long du procédé.

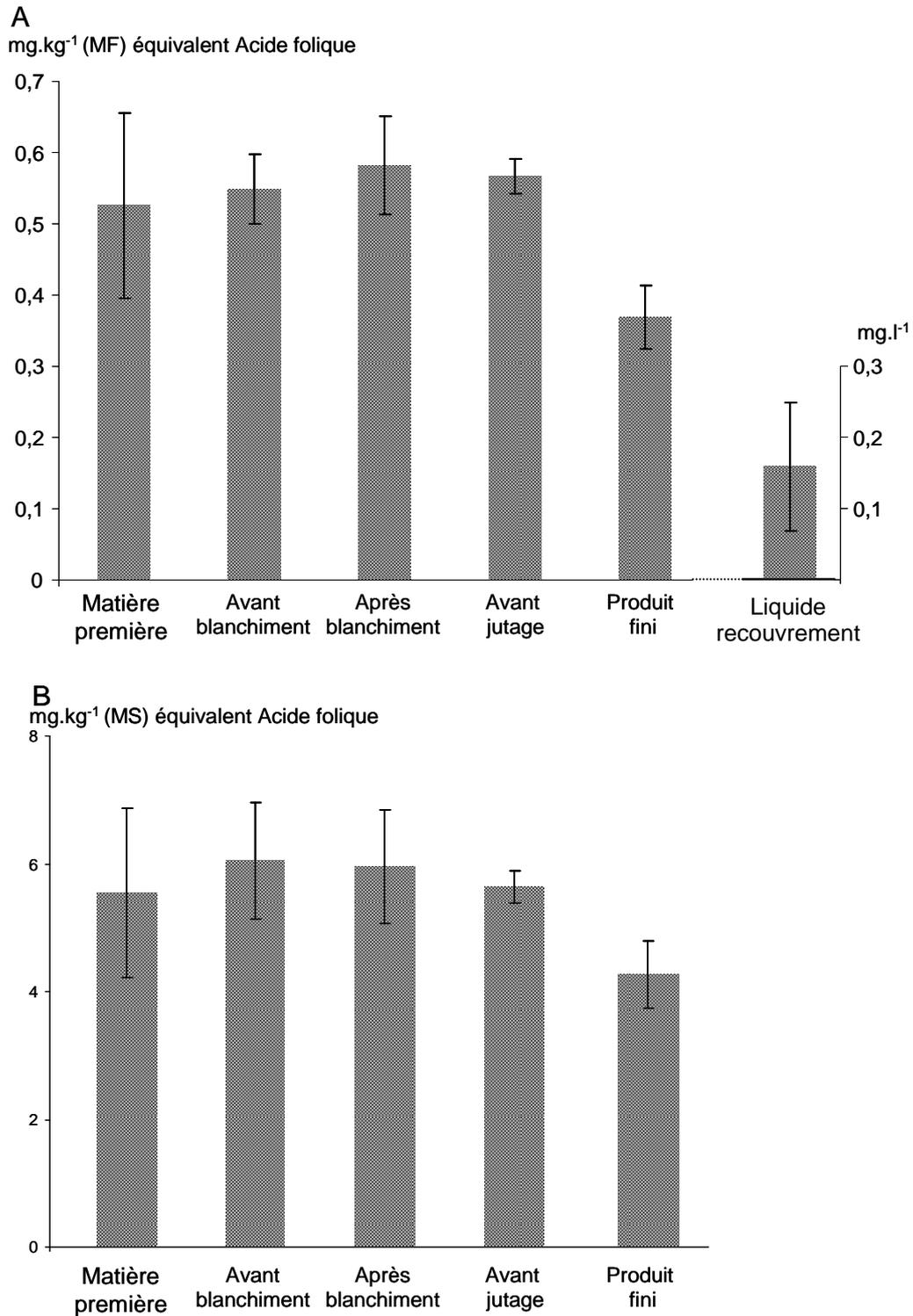


Figure 43 : Evolution de la concentration en folates dans les haricots verts au cours du procédé de transformation

A : concentration par rapport à la matière fraîche ; B : concentration par rapport à la matière sèche
La concentration dans les légumes est exprimée en mg.kg⁻¹ de matière fraîche en équivalent d'acide folique ; la concentration dans les liquides de recouvrement est exprimée en mg.l⁻¹ en équivalent acide folique,

Sur l'ensemble des cinq lots suivis, la concentration en folates n'est pas modifiée par le blanchiment.

Deux modes de blanchiment ont été utilisés dans le procédé de transformation, un blanchiment par aspersion ou un blanchiment par immersion (Figure 44). Avant l'étape de blanchiment, les différences entre les deux lots ne sont pas statistiquement significatives, mais le deviennent après l'étape de blanchiment avec une teneur en folates plus faible après un blanchiment par aspersion.

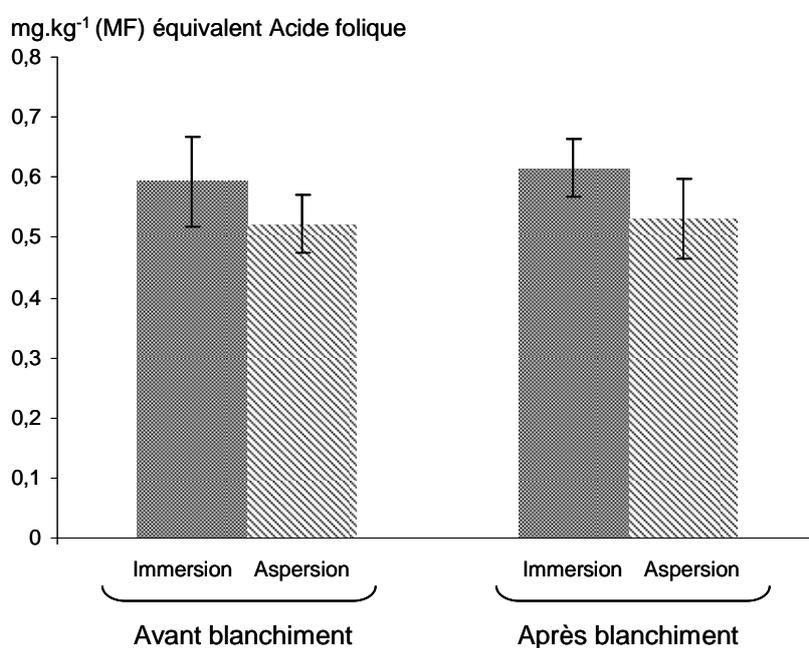


Figure 44 : Impact du mode de blanchiment (aspersion ou immersion) sur la teneur en folate

La concentration en folates avant l'étape d'ajout du liquide de recouvrement est de $0,566 \pm 0,023$ mg.kg⁻¹ (MF). Il n'y a pas de perte en folates entre la fin de l'étape de blanchiment et l'étape d'ajout du liquide de recouvrement.

Avant l'étape de blanchiment, à l'étape de parage, les haricots verts ont été coupés (pour les lots A, C et D) ou laissés entiers (pour les lots B et E). Les concentrations en folates totaux en fonction de la nature des haricots verts (coupés ou non coupés) sont présentées dans la Figure 45. Les concentrations en folates sont légèrement plus élevées au départ pour les lots de

haricots verts non coupés. Cette différence reste plus faible mais devient significativement différente après l'étape de blanchiment. Après le blanchiment, les concentrations sont proches mais significativement plus faibles pour les lots de haricots verts coupés. En revanche, dans le produit fini, la concentration en folates dans les haricots verts non coupés et celle dans les haricots verts coupés ne sont pas significativement différentes.

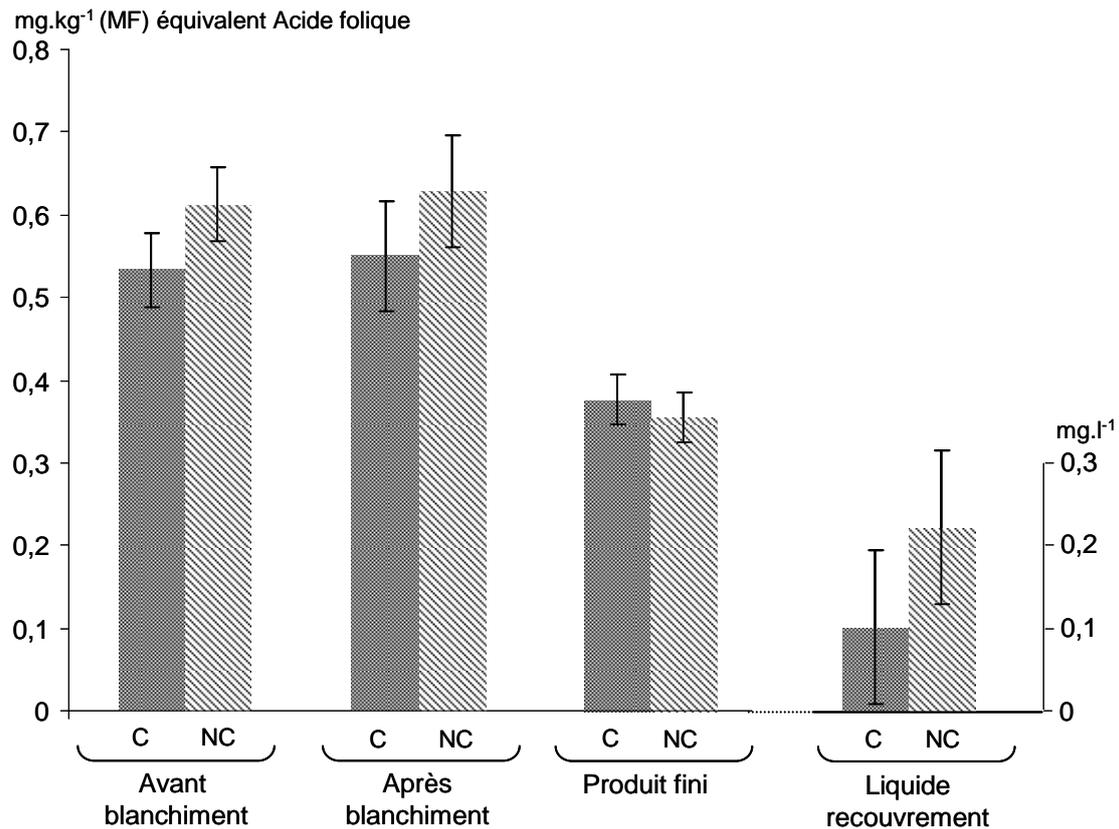


Figure 45 : Impact de la nature des haricots verts sur la concentration en folates au cours du procédé
 La concentration dans les légumes est exprimée en mg.kg⁻¹ de matière fraîche en équivalent d'acide folique ; la concentration dans les liquides de recouvrement est exprimée en mg.l⁻¹ en équivalent acide folique, C : haricots verts coupés ; NC : haricots verts non coupés

La concentration moyenne en folates dans les liquides de recouvrement, juste après la stérilisation, est deux fois plus élevée dans les haricots verts non coupés, ce qui est significatif malgré de très forts écart-types observés pour les haricots verts coupés. La teneur en folates dans le liquide de recouvrement juste après la stérilisation est significativement supérieure pour les haricots verts non coupés.

Trois types de boîtes ont été utilisés dans le procédé de transformation des haricots verts, des boîtes de type 1/4 (poids net égoutté de 212 g) contenant des haricots verts coupés, des boîtes de type 1/2 (poids net égoutté de 425 g), contenant des haricots verts non coupés et des boîtes de type 4/4 (poids net égoutté de 850 g), une partie contenant des haricots verts coupés et une autre partie des haricots verts non coupés. La concentration en folates totaux a été déterminée dans les haricots verts pour chaque type de boîte ainsi que dans les liquides de recouvrement correspondant (Figure 46). Si les concentrations en folates dans les haricots verts sont peu différentes, il n'en est pas de même pour les concentrations dans le liquide de recouvrement, en tout cas pas juste après la stérilisation (Figure 46).

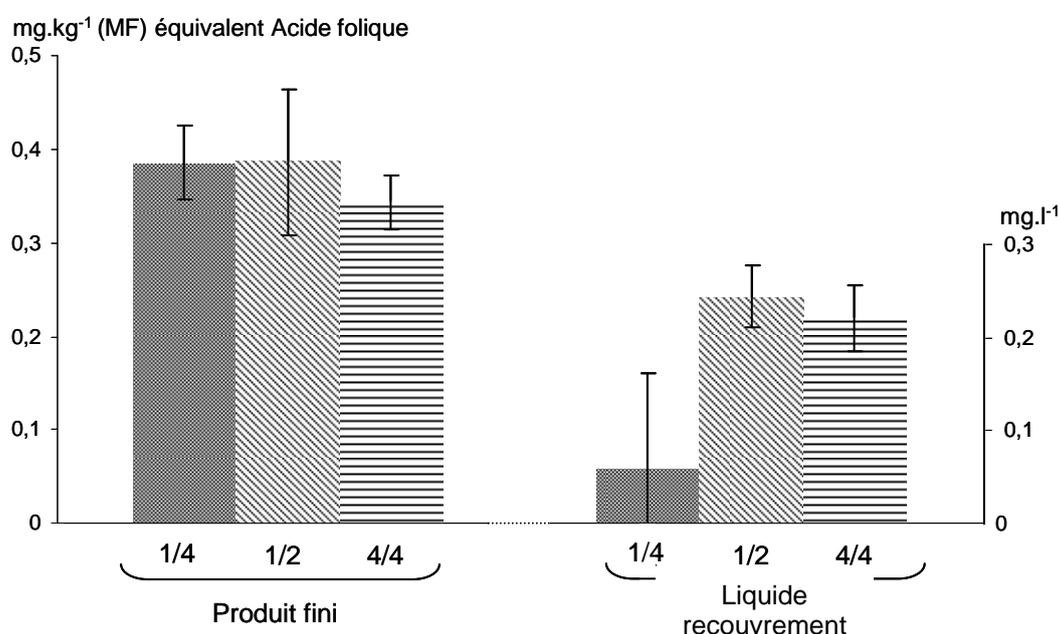


Figure 46 : Impact de la taille de la boîte sur la concentration en folates

La concentration dans les légumes est exprimée en mg.kg⁻¹ de matière fraîche en équivalent d'acide folique ; la concentration dans les liquides de recouvrement est exprimée en mg.l⁻¹ en équivalent acide folique, 1/4 : Boîte de type 1/4 ; 1/2 : Boîte de type 1/2 et 4/4 : boîte de type 4/4

Pour les trois types de boîtes, la concentration en folates dans les liquides de recouvrement est significativement inférieure à la concentration en folate dans les légumes. En effet, le liquide de recouvrement de la boîte 1/4 présente des concentrations en folates nettement plus basses que la boîte 1/2 et 4/4, concentrations qui sont de plus très variables. La différence de concentration en folate dans les différents types de boîtes n'est pas due à la nature des haricots verts (coupés ou non coupés) mais à la taille de la boîte.

1.3.2 Impact de l'appertisation sur les différents dérivés de folate

Le dérivé majoritaire présent dans les haricots verts à la fois dans la matière première et le produit fini est le 5-CH₃-H₄folate qui représente 68 % des folates totaux dans la matière première et 83 % dans le produit fini.

Les deux autres dérivés majoritaires dans les haricots verts sont porteurs d'un groupement formyle. Le 10-HCO-PteGlu, représente 16,5 % des folates totaux dans la matière première et 7 % dans le produit fini. Le 5-HCO-H₄folate représente 8,9 % des folates totaux dans la matière première et 7 % dans le produit fini.

Enfin, les composés minoritaires sont le H₄folate (3,4 et 1,7 %), l'acide folique (1,4 et 0,3 %) le 5,10-CH⁺-H₄folate (0,98 et 0,20 %) et le 10-HCO-H₂folate (0,54 et 0,06 %).

1.3.2.1 5-CH₃-H₄folate

La concentration en 5-CH₃-H₄folate (Figure 47) a été déterminée sur deux lots, le lot A et le lot B. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lots pour la concentration en 5-CH₃-H₄folate à chaque étape du procédé. La concentration en 5-CH₃-H₄folate augmente significativement de 42 % après le blanchiment. Cette concentration baisse significativement après la stérilisation pour un effet global qui est une diminution de 25 % entre la matière première et les haricots verts en boîte.

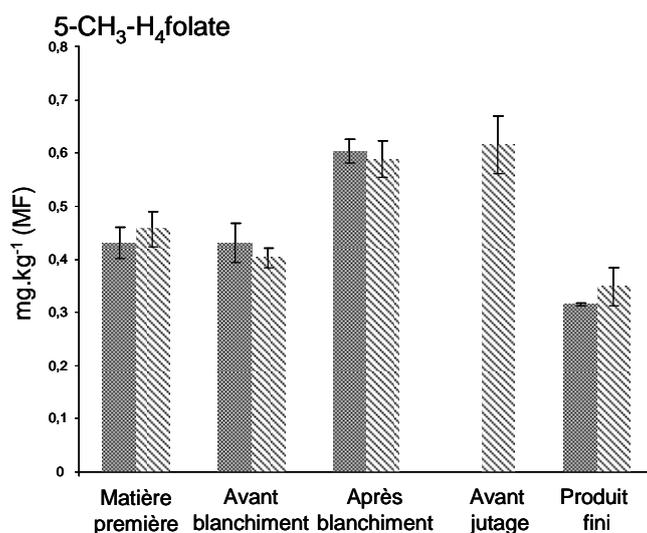


Figure 47 : Impact du procédé de transformation des haricots verts sur la concentration en 5-CH₃-H₄folate

■ : Lot A ; ▨ : Lot B

1.3.2.2 Dérivés formylés

Le deuxième composé dans les haricots verts est le 10-HCO-PteGlu. La concentration en 10-HCO-PteGlu (Figure 48A) baisse très significativement au cours du procédé. Cette baisse a lieu principalement au cours du blanchiment, avec d'ailleurs des évolutions différentes entre les lots A et B.

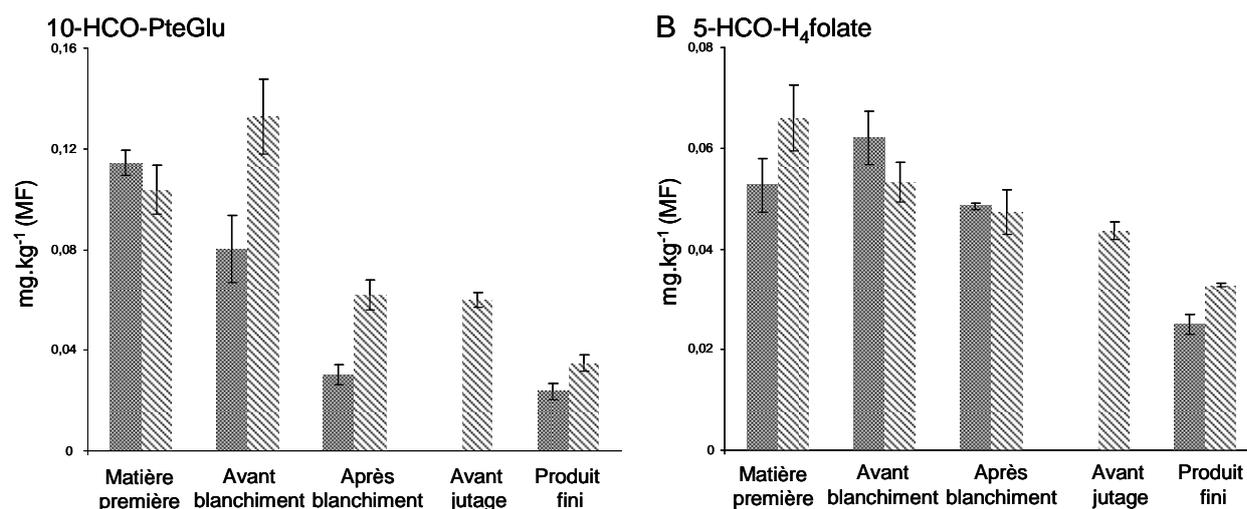


Figure 48 : Impact du procédé de transformation des haricots verts sur la concentration des dérivés formylés

A : impact du procédé de transformation sur la concentration en 10-HCO-PteGlu ; B : impact du procédé de transformation sur la concentration en 5-HCO-H₄folate

■ : Lot A ; ▨ : Lot B

La concentration en 5-HCO-H₄folate (figure 48B) diminue aussi significativement de la matière première au produit fini, la baisse ayant lieu pour ce composé principalement à la stérilisation avec une diminution de 40 %.

1.3.2.3 Dérivés minoritaires

Pour le H₄folate (Figure 49A) et le 5,10-CH⁺-H₄folate (Figure 49C), les concentrations initialement comparables entre les deux lots baissent plus dans les étapes initiales de procédé pour le lot B, et à la stérilisation pour le lot A. Malgré ces comportements différents, les résultats finaux sont très proches.

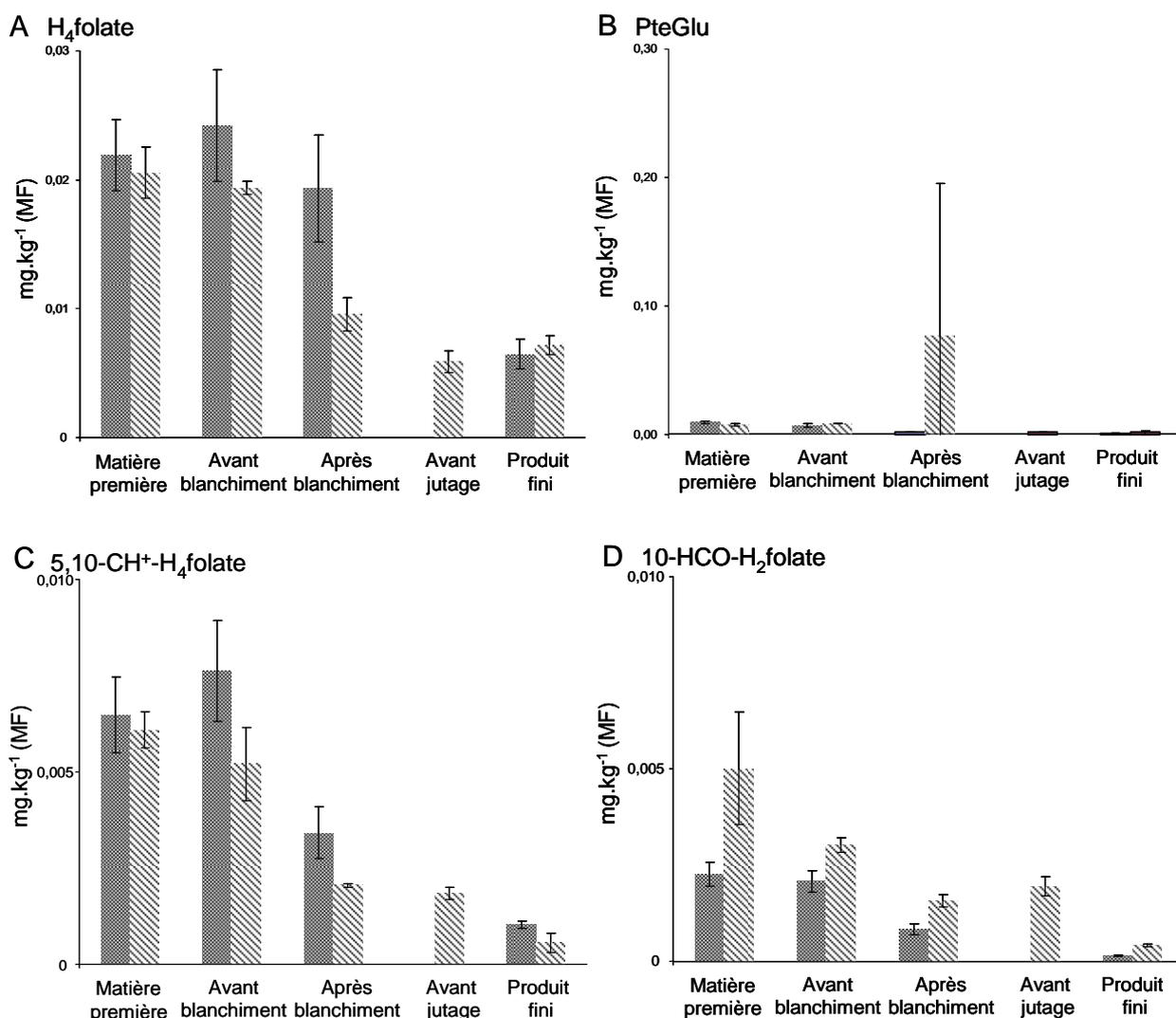


Figure 49 : Impact du procédé de transformation des haricots verts sur les dérivés de folate minoritaires
 A : H₄folate ; B : PteGlu ; C : 5,10-CH⁺-H₄folate ; D : 10-HCO-H₂folate
 ■ : Lot A ; ▨ : Lot B

Pour le 10-HCO-H₂folate (figure 49D), la concentration est significativement plus élevée dans le lot B et le reste jusqu'au produit final. Ici encore, les pertes sont observées dans les étapes initiales du procédé. Le blanchiment n'a cependant pas d'effet significatif sur la perte en 10-HCO-H₂folate.

Enfin, pour l'acide folique (PteGlu) (Figure 49B), la concentration après le blanchiment est aberrante. Cependant, si cette valeur est exclue le procédé de transformation n'induit pas de pertes significatives.

1.3.3 Impact des traitements domestiques

Les cuissons domestiques ont été réalisées à partir de haricots verts frais ou surgelés, soit dans de l'eau à ébullition soit par cuisson à la vapeur. La concentration en folate dans les légumes et dans les liquides de cuisson a été déterminée. Les légumes dans une boîte de conserve et le liquide de recouvrement correspondant ont été analysés.

1.3.3.1 Folates totaux

Les concentrations en folates dans les haricots verts après traitements domestiques sont présentées dans la Figure 50.

La concentration en folates ne diminue pas significativement après cuisson à l'eau bouillante ou à la vapeur pour les haricots verts frais, et la concentration relevée dans les liquides de cuisson est très faible. Par contre, pour les haricots verts surgelés, la diminution observée est statistiquement significative, seulement 80 % des folates sont retrouvés dans les légumes, et la concentration relevée dans les liquides de cuisson est plus élevée.

Enfin, les concentrations dans les haricots verts en conserve et dans leur liquide de recouvrement sont très proches, un équilibre s'est établi au cours du stockage des boîtes.

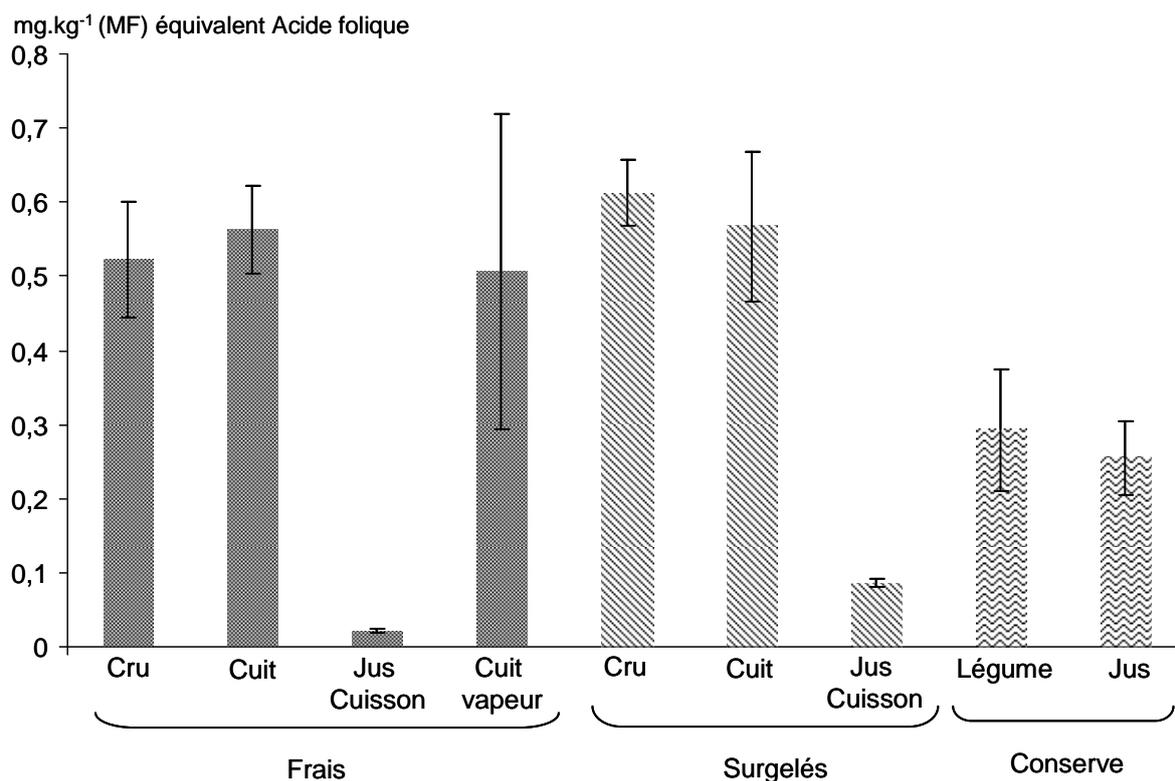


Figure 50 : Concentration en folates dans les haricots verts (crus et cuits) et dans les liquides de cuisson

1.3.3.2 Vitamine C et la lutéine

La concentration en lutéine (Figure 51A) est stable quelque soit le traitement subi, et aurait même plutôt tendance à augmenter après cuisson. Au contraire pour la vitamine C (Figure 51B), les pertes sont très marquées, notamment après cuisson vapeur et la concentration dans les boites de conserve est très faible. A noter que la concentration initiale en vitamine C est plus élevée dans les haricots verts surgelés que frais.

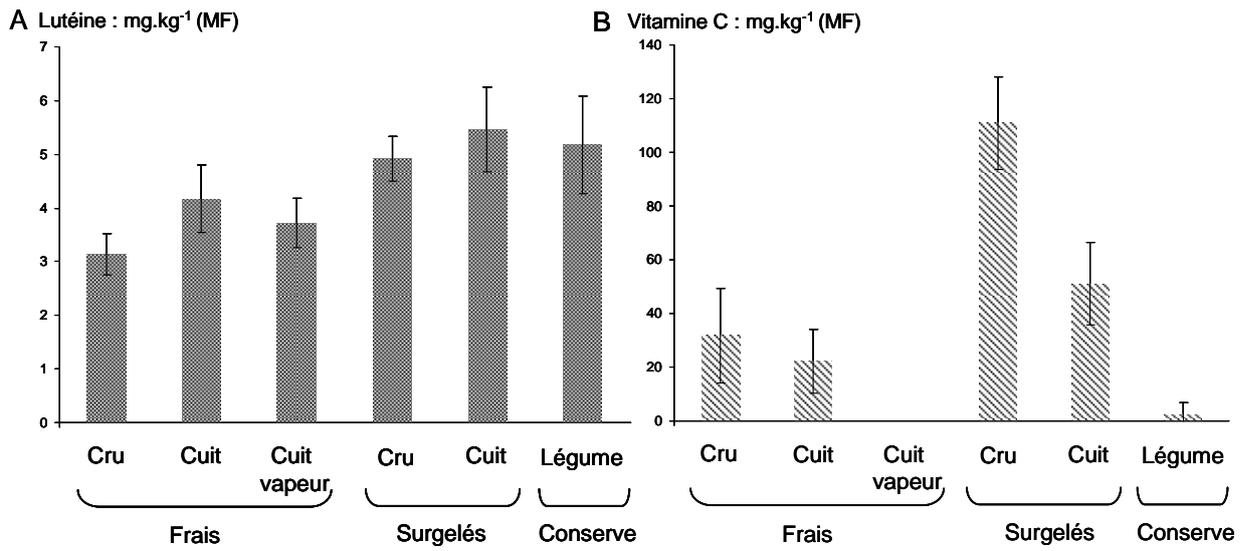


Figure 51 : Concentration en lutéine et vitamine C dans les haricots verts crus et après cuisson

2. Discussion

2.1 Difficultés de l'étude de l'impact du procédé de transformation industriel

Lors de l'étude de l'impact des procédés industriels de transformation sur les folates, nous avons rencontré des difficultés techniques lors du prélèvement des échantillons.

Le prélèvement des échantillons a été réalisé lors de la saison de production qui est relativement courte, c'est pourquoi la production se fait 24 heures sur 24 sur différentes lignes de production. Cette production étant prioritaire, il ne nous a pas été possible d'avoir des plans de prélèvements complets. Par exemple, les haricots verts du lot B et C sont issus du même arrivage, ce lot a été divisé en deux et a fourni des boîtes de type 4/4 et 1/4 avec des haricots verts coupés et non coupés, il n'a pas été fabriqué de boîte de type 1/2. De plus, la matière première du lot E n'a pas pu être prélevée, les haricots verts étaient arrivés à l'usine hors de mes heures de présence, le lendemain matin lorsque nous avons fait les prélèvements, il ne restait plus de haricots verts frais (qui auraient correspondu à la matière première).

Le plan d'expérience pour les épinards est lui plus simple car il ne faisait intervenir qu'un mode de blanchiment et un même mode de surgélation. Cependant, l'arrivée dans la soirée du lot C n'a pas permis un échantillonnage de la matière première.

De plus, le procédé industriel est un processus continu au cours duquel certaines étapes ne sont pas accessibles : c'est le cas notamment à l'étape avant jutage pour les haricots verts, où le prélèvement n'a été possible que sur une seule ligne de production. Ceci a aussi empêché l'établissement de bilan matière, notamment pour le blanchiment et le lavage où il nous a été impossible de prélever l'eau de blanchiment et l'eau de lavage.

2.2 Variabilité de la matière première

Les concentrations relevées pour les épinards frais varient de 1,099 à 1,73 mg.kg⁻¹ par rapport à la matière fraîche, sans que les épinards destinés à la transformation industrielle et achetés au supermarché ne se démarquent particulièrement. Ces concentrations sont en accord avec celles observées dans la littérature, qui varient de 0,96 mg.kg⁻¹ (Rychlik *et al.*, 2004) à 3,64 mg.kg⁻¹ (Iwatani *et al.*, 2003).

Les concentrations dans les haricots verts frais, destinés à la transformation industrielle ou bien achetés au supermarché varient de 0,437 à 0,630 mg.kg⁻¹. Elles sont en accord avec les

concentrations observées dans la littérature, qui varient de 0,37 mg.kg⁻¹ (Muller, 1993) à 0,78 mg.kg⁻¹ (Rychlik *et al.*, 2007).

Les teneurs en folates sont significativement différentes entre le lot A et le lot B d'épinards. Le lot B présente une concentration inférieure à celle du lot A alors que la durée entre le début de la récolte et la stabilisation est inférieure pour le lot B. Les deux lots sont du même cultivar et proviennent du même producteur, l'effet des conditions pédoclimatiques est donc la cause probable de cette différence.

Le suivi sur 24 heures de la concentration en folates dans les épinards ne montre pas de différences. La matrice végétale protège donc les folates de la dégradation. Les épinards lors de cet essai ont été stockés dans l'entrepôt de l'usine, la température n'était pas maîtrisée. O'Hare *et al.* (2012) n'ont pas montré de perte significative en folates lors d'un stockage de choux chinois pendant trois semaines à 4 °C. Dans un même temps, le suivi sur 24h des haricots verts ne montre pas de perte significative dans les 6,5 premières heures. En revanche après 24h, la concentration en folate diminue de 80 %. Ce résultat est en contradiction avec l'étude d'O'Hare *et al.* (2012) et les résultats que nous avons obtenus pour les épinards. Les haricots verts ont été stockés comme les épinards dans l'entrepôt de l'usine. Le prélèvement des haricots verts a été effectué au mois d'Aout 2010 alors que les épinards avaient été prélevés en Octobre 2010. Outre un comportement intrinsèquement différent des feuilles d'épinards et des gousses de haricots verts, la différence de température, non contrôlée dans l'entrepôt, pourrait avoir un rôle.

Des différences statistiquement significatives sont observées pour les concentrations en folates dans les matières premières. Néanmoins, elles restent dans des gammes observées dans la littérature. Ces différences restent d'ailleurs peu marquées (rapport de 1 à 2 pour les épinards et de 1 à 1,5 pour les haricots verts) par rapport à celles rencontrées pour certains microconstituants, notamment les métabolites secondaires.

2.3 Impact des procédés de transformation sur les concentrations en folates totaux

Le procédé industriel de surgélation des épinards ainsi que le procédé d'appertisation d'haricots verts entraînent des pertes en folates. La surgélation des épinards induit une

diminution de la concentration en folate de 38% et le procédé d'appertisation de 30 % par rapport à la matière fraîche. Par rapport à la matière sèche, les pertes au cours du procédé industriel sont de 41 % dans le cas des épinards et 24 % dans le cas des haricots verts.

La diminution des concentrations en folates que nous avons observé au cours de notre étude est en adéquation avec la littérature (Vahteristo *et al.*, 1997 ; Rychlik 2004 ; Scott *et al.*, 2000). Cependant, les études déjà publiées ne font qu'un bilan des pertes entre les végétaux frais et les végétaux transformés et ne prennent pas en compte chaque étape du procédé (Malin 1977 ; Chen *et al.*, 1979 ; Desouza *et al.*, 1986 ; McKillop *et al.*, 2002 ; Melse Boonstra *et al.*, 2002 ; Stea *et al.*, 2006). La perte en folates a été étudiée pour chaque étape des procédés présentant un risque de perte important. La littérature mentionne des pertes en folates au cours du blanchiment des légumes, l'hypothèse d'un phénomène de lessivage a lui aussi était mentionné, c'est pourquoi notre étude s'est focalisée sur les étapes de lavage et de blanchiment. La stérilisation a aussi été étudiée du fait des barèmes thermiques appliqués lors de cette phase et la possibilité de lessivage des folates dans les liquides de recouvrement.

2.4 Traitements hydro-thermiques

Trois traitements hydro-thermiques ont été étudiés, le premier est un traitement par la vapeur qui est un fluide caloporteur. Ce traitement dont la température est de 100°C minimise le contact des légumes avec l'eau. Nous avons étudié ce traitement au cours des cuissons domestiques d'épinards et de haricots verts frais. Le second traitement thermique étudié est le traitement par cuisson dans de l'eau à ébullition ou lors des blanchiments industriels qui font intervenir un contact entre les légumes et l'eau avec des températures de l'ordre de 100 °C. Enfin, le dernier traitement thermique étudié est l'appertisation qui met en jeu des températures supérieures à 100°C (121°C) et où les légumes sont en contact avec l'eau des liquides de recouvrement.

2.4.1 Cuisson vapeur

La cuisson vapeur à partir des épinards et des haricots verts frais n'induit pas de perte en folates. Ce résultat est en adéquation avec ceux de Desouza & Eitenmiller (1986) qui ont montré que la cuisson vapeur n'entraînait pas de perte en folates.

Dans ce traitement, les légumes n'étant pas en contact avec l'eau, seuls des mécanismes de dégradation thermique peuvent se dérouler. Les pH des haricots verts et des épinards sont

similaires et compris entre 5,5 et 6. L'étude de la dégradation du 5-CH₃-H₄folate en solution tampon à pH 5 et 6 montre un temps de demi-vie du 5-CH₃-H₄folate d'environ de 6,5 minutes (Paine Wilson & Chen, 1979 ; Mnkenni & Beveridge, 1983) tandis que Chen & Cooper (1979) avec un pH non précisé a obtenu un temps de demi-vie du 5-CH₃-H₄folate à 100 °C de 21 minutes (Chen 1979). Le cuiseur vapeur que nous avons utilisé n'était pas hermétiquement fermé et donc la pression à l'intérieur était la pression atmosphérique. Des études sur la dégradation thermique couplée à la pression ont été menées. La constante de dégradation pour le 5-CH₃-H₄folate est de $68,31 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 90 °C et à pression 0,1 bars, celles du [6S] et le [6RS] 5-CH₃-H₄folate est de $18,0 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ et de $15,0 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ respectivement (Nguyen *et al.*, 2003 ; Indrawati *et al.*, 2005). Après un traitement thermique de 20 minutes à 100 °C (vapeur), nous n'avons observé aucune perte en folates totaux alors que les temps de demi-vie, donnés dans la littérature pour des solutions modèles, sont plus faibles, y compris pour le vitamère majoritaire. Il semblerait donc que les folates *in situ* soient plus stables et que la matrice végétale joue un rôle de protection vis-à-vis des folates au cours des traitements thermiques tels que la cuisson au cuit vapeur.

La lutéine a un comportement similaire à celui des folates au cours de la cuisson vapeur bien que ce composé soit lipophile. L'augmentation de la concentration en lutéine est probablement due à une augmentation de son extractabilité après la cuisson vapeur comme il a été décrit par Van Den Berg *et al.* (2000). Au contraire, la vitamine C (hydrosoluble comme les folates) est décrite comme étant très thermolabile et dégradée par la cuisson vapeur (Davey *et al.*, 2000).

2.4.2 Blanchiment et cuisson dans de l'eau à ébullition

Les traitements hydro-thermiques que nous avons étudiés sont le blanchiment industriel pour les épinards et les haricots verts et la cuisson dans de l'eau à ébullition pour les épinards et les haricots verts frais et surgelés. Dans ces deux modes de traitements, les intensités et les rapports solide-liquide étaient différents. Les temps de blanchiment industriels des épinards et des haricots verts étaient de 70 à 120 secondes et 4 à 8 minutes respectivement. Les rapports solide-liquide en conditions industrielles sont difficiles à déterminer finement. Cependant les données de l'industriel sont de 5l/kg à 50 l/kg pour les haricots verts et de 20 m³/h/m² de tapis roulant pour les épinards. Dans le cas des cuissons dans de l'eau à ébullition des épinards et des haricots verts frais ou surgelés, les rapports solides-liquides étaient de 1g/4ml pour les épinards frais, 1g/2ml pour les haricots verts frais et 1g/2ml pour les deux légumes surgelés.

Les temps de cuisson appliqués dans le cas de l'étude de traitements domestiques étaient de 8 minutes pour les deux légumes frais, de 15 minutes pour les épinards surgelés et de 13 minutes pour les haricots verts surgelés.

Les temps de traitement et les températures appliqués sont moins intenses pour le blanchiment industriel tandis que les rapports solide-liquide sont plus élevés dans le cas des procédés industriels que dans le cas des procédés domestiques.

L'impact des traitements hydrothermiques sur la perte en folates a été étudié (Chen *et al.*, 1979, DeSouza *et al.*, 1986 ; McKillop *et al.*, 2002 ; Melse Boonstra *et al.*, 2002). Dans ces études le pourcentage de perte en folates au cours de ces traitements varie de 10 à 51 %. Dans ces études, le rapport solide liquide était de 0,02 g/ml à 2,5 g/ml et le temps de cuisson variait de 2 à 4 minutes. Selman (1994) a rapporté que le pourcentage de perte en folates au cours de traitement de cuisson dans de l'eau à ébullition dans les légumes feuilles varie de 20 à 40 % et d'environ 50 % dans le cas des légumes racines. Cependant, l'étude de Klein *et al.* (1979) sur le traitement des haricots verts pendant 9 minutes à 100 °C ne montre pas de perte en folates ce qui est en accord avec nos résultats. Globalement, la littérature montre des résultats intermédiaires entre le blanchiment industriel et les traitements domestiques que nous avons menés.

Le blanchiment industriel que nous avons étudié n'a pas d'effet statistiquement significatif par rapport à la matière fraîche mais induit une diminution de 20 % de la concentration par rapport à la matière sèche pour les épinards. Il est à noter qu'à cette étape, la teneur en matière sèche augmente de 23 %. Il semble donc qu'une partie au moins des folates ait été entraînée avec l'eau perdue.

En revanche, le blanchiment n'induit aucune perte en folates par rapport à la matière fraîche et la matière sèche pour les haricots verts ce qui est en accord avec les résultats de Chen *et al.* (1979).

Des pertes marquées en folates ont été observées pour les épinards frais, surgelés et pour les haricots verts surgelés lors des cuissons domestiques. Pour les épinards, la perte par diffusion au cours de la cuisson dans de l'eau à ébullition des épinards frais est de 25 %, et pour les épinards surgelés de 50 %. La perte en folates dans les haricots verts frais n'est pas significative et est de 20 %, par diffusion, dans la cuisson des haricots verts surgelés.

Enfin, la proportion de folates dans les liquides de cuisson est influencée par :

- La géométrie du légume, une surface plane dans le cas des épinards et un cylindre dans le cas des haricots verts ;
- L'état de déstructuration des légumes où la perte est plus élevée dans le cas des cuissons à partir de légumes surgelés qu'à partir de légumes frais.

La vitamine C a un comportement analogue à celui des folates bien que les pertes soient plus importantes au cours des cuissons domestiques. La vitamine C n'a pas été mesurée dans les liquides de cuisson c'est pourquoi ne nous pouvons estimer la part de diffusion et la part de dégradation thermique. La perte est plus élevée pour les épinards (75 %) que pour les haricots verts (30 % pour les haricots verts frais et 54 % pour les haricots verts surgelés). Tout comme pour les folates, il semblerait que la géométrie de la matrice végétale influence la perte en vitamine C.

A contrario, la concentration en lutéine augmente au cours des cuissons dans de l'eau bouillante, ce phénomène analogue à celui de la cuisson vapeur est probablement dû à une augmentation de son extractabilité après cuisson, puisque la teneur en matière sèche diminue.

Dans le procédé de transformation industriel des haricots verts, deux types de blancheurs ont été utilisés, un blancheur par immersion ou un blancheur par aspersion. La concentration en folate avant l'étape de blanchiment est la même quelque soit le type de blancheur utilisé. En revanche, après l'étape de blanchiment, la concentration en folates est plus faible dans les haricots verts blanchis par aspersion. Le temps de blanchiment appliqué pour le blanchiment par aspersion est de 9 minutes en moyenne alors que le temps de blanchiment par immersion est de 6 minutes en moyenne. Le temps plus court appliqué au blanchiment par immersion pourrait expliquer une concentration en folates plus élevée.

2.4.3 L'appertisation

La perte en folates observée au cours de l'appertisation se décompose en une perte nette et une perte par lessivage des folates vers le liquide de recouvrement, de l'ordre de 20 % en sortie de stérilisateur. Dans l'étude des traitements domestiques la concentration en folates

dans les haricots verts et dans les liquides de recouvrement est à l'équilibre. L'équilibre entre les légumes et les liquides de recouvrement était atteint aussi pour les épinards.

DeSouza & Eitenmiller (1986) ont déterminé la concentration en folates dans des épinards en conserve de $0,17 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les légumes et $0,44 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans le liquide de recouvrement après trois mois de stockage des boîtes de conserve. De plus, la concentration en folates dans les pois et pois chiche est de $0,78$ et $0,45 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les légumes et est de $0,42$ et $0,32 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les liquides de recouvrement (Dang *et al.*, 2000).

Le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) ainsi qu'Aérial ont suivi l'évolution des teneurs en folates dans les haricots verts ainsi que dans les liquides de recouvrement au cours du stockage pendant 24 mois. Les résultats (non présentés) montrent que l'équilibre de la concentration en folates est atteint au 6^{ème} mois de stockage.

Ces résultats sont donc en faveur d'un mécanisme de diffusion impliqué dans les pertes en folates au cours de l'appertisation, plus qu'un phénomène de dégradation thermique.

A la sortie du stérilisateur, la concentration en folates dans les liquides de recouvrement pour les haricots verts coupés est inférieure à celle des haricots verts non coupés, ce qui est contre intuitif. La concentration en folates des haricots verts « coupés » est la moyenne de la concentration en folates dans les haricots verts mis dans des boîtes de type 1/4 et 4/4. La concentration en folates des haricots verts « non coupés » est la moyenne de la concentration en folates dans les haricots verts mis dans des boîtes de type 1/2 et 4/4. Les temps de stérilisation et les barèmes de température appliqués sont différents pour les trois types de boîtes. En réalité, la différence de concentration ne semble pas être due au fait que les haricots verts soient « coupés » ou « non coupés », mais plus à la cinétique de diffusion des folates dans les différentes boîtes. Les boîtes 4/4 ont un temps de séjour plus long dans le stérilisateur que les boîtes 1/4. De plus, lors des prélèvements des échantillons, nous avons directement congelé les boîtes de conserve à leur sortie des stérilisateurs, la congélation a été plus rapide pour les boîtes 1/4 (haricots verts coupés) que pour les boîtes 4/4 (haricots verts non coupés). Nous aurions donc ici un effet cinétique amenant à une concentration en folates dans les liquides de recouvrement plus faible pour les haricots verts des boîtes 1/4 que celle des boîtes 4/4.

2.5 *Le lavage*

Le lavage entraîne une diminution de la teneur en folates exprimée en matière fraîche mais pas lorsque celle-ci est exprimée en matière sèche, pour les épinards. Le lavage des épinards se fait dans de l'eau entre 15 et 25 °C. Au cours de cette étape, la perte par dégradation thermique ne peut être le mécanisme impliqué dans les pertes observées.

Au cours de l'étape de lavage, la matière sèche diminue mais moins que la teneur en folates. Les difficultés techniques rencontrées lors du prélèvement des épinards ainsi que l'aspect continu du procédé ne permet pas de faire un bilan de matière à cette étape. C'est pourquoi nous ne pouvons savoir si au cours de cette étape, la diminution de la concentration en folates en matière fraîche est due à un phénomène de dilution par entrée d'eau ou par un phénomène de sortie de petites molécules solubles.

Cependant, les données de l'industriel concernant les rendements (entrée-sortie) sur les lignes de surgélation des épinards calculés à partir de 1 à 2 tonnes de matière première sont de 70 à 97 %, la dilution semble donc moins probable.

Un mécanisme de lessivage des folates est donc à l'origine de la perte en folates de 25% dans les épinards, en cohérence avec l'hypothèse émise par Scott *et al.* (2000).

2.6 *La surgélation*

La surgélation n'induit pas de perte en folates par rapport à la matière fraîche. Au cours de cette étape, nous observons une augmentation de la matière sèche. Entre le blanchiment et la surgélation, il y a l'étape de claquage où les épinards sont écrasés sous forme de galet. L'augmentation de la matière sèche après la surgélation est due cette étape qui induit une perte en eau par phénomène d'égouttage. Il semble probable que la diminution de la teneur en folate par rapport à la matière sèche résulte de leur entrainement avec l'eau lors de l'étape du claquage.

2.7 *Impact des procédés industriels sur les dérivés de folates*

La plupart des études concernant la perte en folates au cours de la transformation des légumes ou des traitements de cuisson domestique sont présentés sous forme de teneurs totales en folate, que se soit en équivalent acide folique ou équivalent 5-CH₃-H₄folate. Nous avons

déterminé la proportion de certains dérivés pour chaque étape de traitement, dans le cas du procédé de transformation des épinards et des haricots verts.

Comme l'a mentionné Scott (Scott *et al.*, 2000), le principal dérivé présent dans les haricots verts et les épinards est le 5-CH₃-H₄folate. Ceci a été confirmé par Freisleben *et al.* (2003) qui a déterminé que le 5-CH₃-H₄folate représente environ 75% des folates totaux pour les épinards et Rychlik *et al.* (2007), qui a constaté que le composé majeur dans les haricots verts est le 5-CH₃-H₄folate (Rychlik *et al.*, 2007).

Ce dérivé est peu affecté par le procédé à la fois dans la transformation des épinards et des haricots verts. Gutzeit *et al.* (2008) ont montré que la préparation de concentré de jus de fruits et la préparation de jus de baies d'argousier n'induit aucune perte du 5-CH₃-H₄folate (Gutzeit *et al.*, 2008). Le 5-CH₃-H₄folate apparaît être relativement stable au cours de la transformation des fruits et des légumes.

Les dérivés formylés sont la deuxième classe la plus abondante des dérivés de folates à la fois dans les haricots verts et les épinards où ils sont pour la plupart représentés par le 10-HCO-PteGlu et le 5-HCO-H₄folate. La proportion du 10-HCO-PteGlu diminue dans les deux légumes et le 5-HCO-H₄folate n'a diminué que dans les épinards. Ils sont donc proportionnellement plus perdus que le 5-CH₃-H₄folate.

La baisse du 5-HCO-H₄folate et du 10-HCO-PteGlu est corrélée à une augmentation du PteGlu et du H₄folate ce qui pourrait être dû à des interconversions de ces dérivés. Le comportement des composés mineurs tels que l'acide folique (PteGlu), H₄folate et 5,10-CH⁺-H₄folate, est complètement différent entre les épinards, où il y a augmentation de leur proportion, et les haricots verts avec une diminution de leur proportion. Cependant, les concentrations de ces derniers dérivés étant très faible, la variabilité analytique peut être plus élevée que la variabilité biologique.

2.8 Conclusions

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de perte en folates dans les épinards et les haricots verts au cours de la cuisson vapeur et lors des blanchiments industriels, contrairement à la vitamine C.

En revanche, l'étape de lavage au cours du procédé industriel de surgélation des épinards induit une diminution de la concentration en folates en matière fraîche. Les cuissons dans de

l'eau à ébullition (épinards frais et surgelés et haricots verts surgelés) ainsi que la stérilisation des haricots verts lors du procédé industriel d'appertisation induisent des pertes en folate. Cependant, lorsque les bilans matière ont été possibles, les folates perdus dans les légumes sont en majeure partie retrouvés dans les liquides de cuisson ou dans les liquides de recouvrement.

Au cours des procédés de transformation industriels et domestiques, il apparaît que le mécanisme majeur impliqué dans la perte en folates soit un mécanisme de diffusion plus qu'un mécanisme de dégradation thermique.

Chapitre 5 :

*Diffusion des folates à partir de
légumes cuits*

1. Diffusion des molécules hydrophiles à partir de légumes cuits

Au cours du procédé industriel de surgélation des épinards et d'appertisation des haricots verts, les pertes en folates ont lieu lors de l'étape de lavage et lors de l'étape de stérilisation, respectivement. Le dosage dans les liquides de recouvrement des boîtes de conserve de haricots verts a montré que 1/3 des folates sont retrouvés dans le liquide à la fin du procédé. Un équilibre de la concentration en folate a été établi entre les légumes et les liquides de recouvrement pour des boîtes de conserves d'épinards et de haricots verts achetés au supermarché. Les cuissons domestiques (eau à ébullition) induisent des pertes en folates, la majeure partie des folates étant récupérés dans les liquides de cuisson. Dans un même temps, le blanchiment industriel ainsi que la cuisson au cuit vapeur n'induisent pas de pertes significatives en folates, que ce soit pour les haricots verts et les épinards.

Il apparaît donc que le mécanisme majeur de perte en folate est un lessivage de ces molécules vers les liquides environnants, plus qu'un mécanisme de dégradation thermique.

Afin d'étudier le mécanisme de diffusion, un dispositif expérimental a été mis en place. La cinétique de diffusion des folates à partir d'épinards et de haricots verts préalablement cuits a été étudiée pour trois températures (25, 45 et 65 °C), à deux pH (5 et 7) sous agitation continue, avec des rapports solide liquide de 50 g/l pour les épinards et 100 g/l pour les haricots verts. La cinétique de diffusion a été suivie pendant 4 heures. La concentration en folates totaux, exprimée en équivalent de 5-CH₃-H₄folate, a été déterminée dans les légumes par HPLC avec une détection fluorimétrique. La concentration des différents dérivés de folates a été déterminée pour les échantillons C₀ (avant diffusion) et C_∞ (après 4 h de diffusion), par LC-MS. Les sucres et acides ont été dosés dans les échantillons à l'aide de kits enzymatiques.

La modélisation des données a été réalisée à l'aide de la deuxième loi de Fick dans le but de déterminer, pour les folates et pour les sucres et acides, la constante de diffusivité (D) et la quantité résiduelle.

1.1 Démarche de la modélisation

L'approche développée pour calculer le coefficient de diffusivité (D) des solutés hydrophiles, ici les folates, les sucres et les acides, est basée sur la deuxième loi de Fick, dont l'équation générale est :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 C}{\partial r^2}$$

Équation 5

Dans cette équation, C désigne la concentration de la molécule, t le temps et r une distance caractéristique.

La modélisation des résultats nécessite de prendre en compte la géométrie des légumes étudiés. C'est pourquoi, les épinards sont assimilés à une plaque infinie et les haricots verts à un cylindre.

Dans le cas des plaques infinies, la solution de la deuxième équation de Fick est :

$$\frac{C(t) - C_\infty}{C_0 - C_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp\left(-\frac{D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4l^2}\right)$$

Équation 6

Où $C(t)$ est la concentration en folate au temps t , C_0 la concentration initiale et C_∞ la concentration au temps infini, D la constante de diffusivité et l la demie épaisseur de la plaque.

Dans le cas des cylindres, la solution de la deuxième équation de Fick est :

$$\frac{C(t) - C_\infty}{C_0 - C_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4}{a^2 \alpha_n^2} \exp(-D \alpha_n^2 t)$$

Équation 7

Où $C(t)$ est la concentration en folate au temps t , C_0 la concentration initiale et C_∞ la concentration au temps infini, D la constante de diffusivité et a le rayon du cylindre.

Dans cette équation, α_n correspond aux racines de l'équation dans laquelle J_0 est la fonction de Bessel d'ordre 0 (Equation 8).

$$J_0(a\alpha_n) = 0$$

Équation 8

La robustesse du modèle de diffusion a été déterminée en calculant le coefficient de corrélation r^2 :

$$r^2 = 1 - \left(\frac{\sum (obs - cal)^2}{\sum (obs - m_{cal})^2} \right)$$

Équation 9

Où : *obs* est la concentration en folates déterminée expérimentalement, *cal* est la concentration déterminée par le modèle et m_{cal} est la moyenne des concentrations calculées.

1.2 Diffusion des molécules hydrosolubles à partir des épinards

1.2.1 Diffusion des folates

1.2.1.1 Données brutes

Les concentrations en folates totaux, exprimées en mg.kg^{-1} de matière fraîche, en équivalent 5- $\text{CH}_3\text{-H}_4$ folate monoglutamate, sont présentées dans la Figure 52.

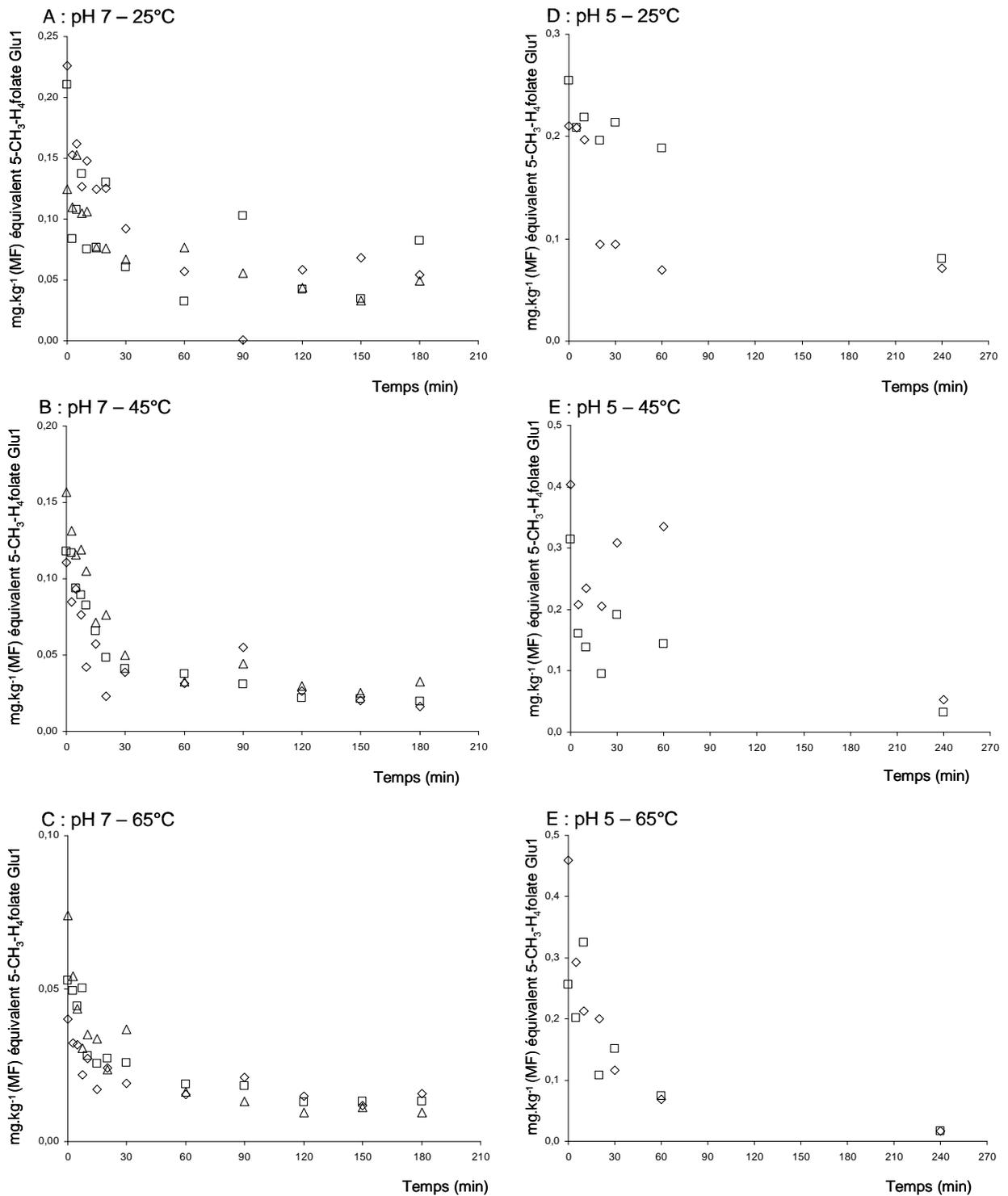


Figure 52 : Concentrations en folates (équivalent 5-CH₃-H₄folate monoglutamate) au cours du temps dans les épinards des cinétiques de diffusion à pH 7 et 5 et aux trois températures étudiées.

◇ : Lot 1 ; □ : Lot 2 ; △ : Lot 3

Les concentrations en folates à t₀ pour les deux pH et les trois températures étudiées varient faiblement entre les différents lots étudiés. On observe seulement une concentration en folate plus faible pour les expériences à pH 7 et à 65 °C. Cependant la concentration en folate à t₀

pour cette condition est la même pour les trois lots étudiés. Dans toutes les conditions, la concentration en folates diminue d'abord rapidement au cours du temps. Cette diminution est exponentielle avec l'apparition d'un plateau après 60 minutes d'expérience.

1.2.1.2 Modélisation

La modélisation des données expérimentales a été réalisée à l'aide de la seconde loi de Fick. Deux raisons ont conduit à l'utilisation de cette loi :

- C'est le modèle classique utilisé pour décrire les phénomènes de diffusion des solutés hydrosolubles.
- La forme des cinétiques de diffusion, avec une décroissance initiale de type exponentielle et un plateau, correspond bien à la solution de l'équation de la deuxième loi de Fick pour des plaques infinies

La modélisation a été réalisée de la même façon pour toutes les conditions de pH et de température étudiées. Cependant, je ne présenterai dans ce paragraphe qu'un exemple représentatif de toutes les cinétiques. Les modélisations de l'ensemble des données sont présentées en Annexe.

L'exemple choisi est celui de la modélisation de la diffusion des folates du lot 2 à pH 7 et à 45 °C. Les données expérimentales montrent que la diffusion des folates a lieu au cours des premières 60 minutes, jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Le C_{∞} a donc été déterminé comme la moyenne des concentrations en folate entre 60 et 240 min.

Le résultat du modèle obtenu pour la diffusion des folates à partir des épinards du lot 2 à pH 7 et à 45 °C est présenté dans la Figure 53.

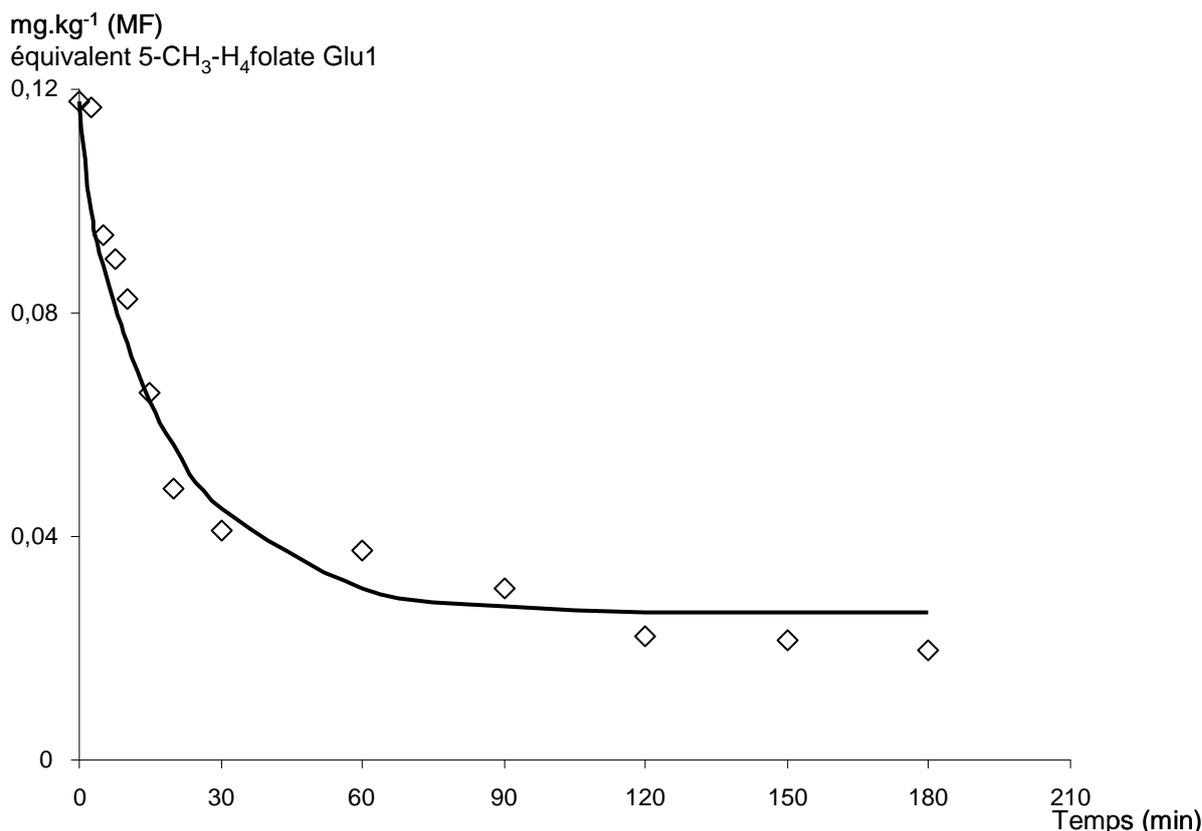


Figure 53 : Modélisation de la cinétique de diffusion des folates à partir des épinards du lot 2 à pH 7 et à 45 °C

◇ : Données expérimentales ; — : Modèle de diffusion

Le modèle de Fick obtenu semble satisfaisant. La forme de la courbe est en accord avec les résultats expérimentaux que nous avons obtenus. De plus, pour toutes les cinétiques de diffusion le coefficient de corrélation entre le modèle théorique et les concentrations expérimentales obtenues a été calculé, indiquant la robustesse du modèle. Dans cet exemple, le coefficient de corrélation obtenu est de 0,98, la valeur du coefficient de corrélation confirme donc que le modèle de Fick est bien adapté à la modélisation de ces données. A partir de ce modèle, la constante de diffusivité des folates a été déterminée, dans cet exemple elle est de $6,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

1.2.1.3 Constantes de diffusivité et quantités résiduelles des folates à partir des épinards

Les constantes de diffusivité ainsi que la quantité résiduelle en folates dans les épinards, pour les deux pH (7 et 5) et les trois températures (25, 45 et 65 °C), et les coefficients de corrélation associés sont présentés dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Constantes de diffusivité et quantités résiduelles en folates dans les épinards

pH	Température	Lot	D (m ² .s ⁻¹)	r ²	Moyenne	C _∞ / C ₀	Moyenne
7	25 °C	1	6,0.10 ⁻¹²	0,97	7,6.10 ⁻¹²	0,21	0,27
		2	1,0.10 ⁻¹¹	0,87		0,28	
		3	7,0.10 ⁻¹²	0,96		0,34	
	45 °C	1	9,0.10 ⁻¹²	0,95	7,0.10 ⁻¹²	0,27	0,23
		2	6,0.10 ⁻¹²	0,98		0,22	
		3	6,0.10 ⁻¹²	0,99		0,21	
	65 °C	1	6,0.10 ⁻¹²	0,97	6,6.10 ⁻¹²	0,39	0,28
		2	8,0.10 ⁻¹²	0,96		0,29	
		3	6,0.10 ⁻¹²	0,94		0,16	
5	25 °C	1	8,0.10 ⁻¹²	0,95	6,5.10 ⁻¹²	0,34	0,33
		2	5,0.10 ⁻¹²	0,92		0,32	
	45 °C	1	9,0.10 ⁻¹²	0,86	9,0.10 ⁻¹²	0,48	0,38
		2	9,0.10 ⁻¹²	0,90		0,28	
	65 °C	1	9,0.10 ⁻¹²	0,98	8,0.10 ⁻¹²	0,09	0,11
		2	7,0.10 ⁻¹²	0,87		0,14	

La constante de diffusivité des folates à partir des épinards est du même ordre, 10⁻¹² m².s⁻¹, pour l'ensemble des températures et les deux pH étudiés. Ces résultats montrent que ni la température, ni le pH n'ont d'effet sur la vitesse de diffusion des folates. En revanche, la quantité résiduelle en folates dans les épinards est similaire (environ 30 %) pour les trois températures à pH 7 alors qu'elle diminue à pH 5, notamment à 65 °C. De plus, la quantité résiduelle en folates semble être plus élevée à pH 5 qu'à pH 7 pour les températures 25 et 45 °C. La température semble donc avoir un effet sur la quantité résiduelle mais ceci seulement à pH 5. Le pH semble quant à lui avoir aussi un effet sur la quantité résiduelle en folates, notamment à 45 et 65 °C.

1.2.1.4 Diffusion des dérivés de folates

La concentration des différents dérivés de folates a été déterminée par LC-MS dans les échantillons au temps zéro et au temps final de l'expérience. Les concentrations en mg.kg⁻¹ par rapport à la matière fraîche des différents dérivés dans les épinards sont présentées dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Concentrations des dérivés de folates à t₀ et t_∞ (mg.kg⁻¹) dans les épinards

pH	°C	Temps	5-CH ₃ -H ₄ folate	5-HCO-H ₄ folate	10-HCO-PteGlu	H ₄ folate	PteGlu	5,10-CH ⁺ -H ₄ folate	10-HCO-H ₂ folate	Somme (équivalent acide folique)	C/C ₀ HPLC-Fluo
7	25	t ₀	0,302	0,057	0,022	0,015	0,003	0,003	0,010	0,395	0,27
		t ₁₈₀	0,069	0,007	0,005	0,001	0,001	0,000	0,003	0,083	
		C/C ₀	0,22	0,12	0,24	0,07	0,35	0,07	0,26	0,21	
	45	t ₀	0,189	0,010	0,027	0,004	0,001	0,000	0,010	0,230	
		t ₂₄₀	0,017	0,002	0,003	0,001	0,001	0,000	0,001	0,024	
		C/C ₀	0,09	0,18	0,12	0,41	0,58	0,42	0,07	0,11	
	65	t ₀	0,137	0,027	0,020	0,005	0,002	0,001	0,010	0,193	
		t ₂₄₀	0,002	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,005	
		C/C ₀	0,01	0,05	0,06	∅	0,31	∅	∅	0,03	
5	25	t ₀	0,280	0,064	0,013	0,012	0,002	0,002	0,003	0,361	0,33
		t ₂₄₀	0,102	0,056	0,011	0,004	0,002	0,002	0,003	0,171	
		C/C ₀	0,36	0,86	0,86	0,33	0,76	0,85	0,86	0,48	
	45	t ₀	0,344	0,109	0,008	0,039	0,002	0,003	0,002	0,484	
		t ₂₄₀	0,051	0,045	0,008	0,002	0,002	0,000	0,002	0,105	
		C/C ₀	0,14	0,41	1,08	0,05	0,81	0,02	1,24	0,22	
	65	t ₀	0,350	0,126	0,009	0,035	0,003	0,003	0,003	0,506	
		t ₂₄₀	0,002	0,036	0,013	0,002	0,001	0,000	0,001	0,052	
		C/C ₀	0,007	0,28	1,41	0,05	0,48	0,01	0,41	0,10	

∅ : non déterminé ; HPLC-Fluo : données obtenues par le dosage des folates totaux en HPLC avec une détection en fluorimétrie

Le composé majoritaire présent dans les épinards à t₀ est le 5-CH₃-H₄folate, qui représente entre 70 et 80 % des folates totaux, les autres dérivés étant minoritaires.

A pH 7, la quantité résiduelle de 5-CH₃-H₄folate diminue avec la température, la même tendance est observée à pH 5. La quantité résiduelle du 5-CH₃-H₄folate est plus élevée à pH 5 qu'à pH 7. Pour le 5-CHO-H₄folate et le 10-HCO-PteGlu, la teneur résiduelle est plus élevée à pH 5. Pour le 10-HCO-PteGlu, la teneur augmente quand la température augmente.

Pour les dérivés mineurs, les teneurs initiales sont soit faibles et très variables (H₄folate et 10-HCO-H₂folate) soit très faibles (PteGlu et 5,10-CH⁺-H₄folate), il n'est donc pas possible de conclure avec certitude.

Globalement les C/C₀ obtenus par le dosage en HPLC avec une détection en fluorimétrie sont supérieurs à ceux observés par la somme des concentrations des dérivés (en équivalent acide folique), notamment à 65 °C et pH 7. Le dosage en HPLC avec détection en fluorimétrie

nécessité la conversion de l'ensemble des dérivés en 5-CH₃-H₄folate. Cette méthode peut être l'explication de cette quantité résiduelle supérieure, où elle dériverait des composés de dégradation en 5-CH₃-H₄folate.

1.2.2 Diffusion des sures et acides

Les sucres et acides sont des molécules hydrosolubles, présentant une forte stabilité chimique lors des traitements thermiques, par exemple. C'est pourquoi, afin de valider notre modèle, nous avons étudié leurs diffusions. Cette diffusion présente les mêmes caractéristiques que celle des folates. Elle a donc aussi été modélisée à l'aide de l'Equation 6.

Les seuls sucres et acides présents en quantité raisonnable dans les épinards sont le glucose et l'acide malique, c'est pourquoi la diffusion n'a été modélisée que pour ces deux molécules.

La modélisation a été réalisée sur la moyenne de trois lots pour le pH 7 et de deux lots pour le pH 5, au trois températures. Le modèle a été ajusté et le coefficient de corrélation calculé. Le modèle a été validé lorsque le coefficient r^2 était le plus élevé.

La constante de diffusivité déterminée à partir du modèle de diffusion et le coefficient de corrélation associé sont présentés dans le Tableau 38. Les quantités résiduelles de sucres et acides dans les épinards à la fin de l'expérience sont présentées dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Constantes de diffusivité et quantités résiduelles en glucose et acide malique dans les épinards

	pH	Température (°C)	D (m ² .s ⁻¹)	r ²	C _∞ /C ₀
Glucose	7	25	3,0.10 ⁻¹²	0,97	0,50
		45	1,0.10 ⁻¹¹	0,96	0,30
		65	∅	∅	0,86
	5	25	6,0.10 ⁻¹²	0,77	0,54
		45	8,0.10 ⁻¹²	0,82	0,02
		65	9,5.10 ⁻¹²	0,91	0,27
Acide malique	7	25	3,5.10 ⁻¹²	0,96	0,49
		45	6,0.10 ⁻¹²	0,97	0,19
		65	2,5.10 ⁻¹¹	0,99	0,52
	5	25	3,5.10 ⁻¹²	0,87	0,57
		45	5,5.10 ⁻¹²	0,91	0,55
		65	2,5.10 ⁻¹¹	0,94	0,27

∅ : non déterminé

Les constantes de diffusivité calculées pour le glucose et l'acide malique sont d'environ 10^{-12} $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, elles sont du même ordre que celles calculées pour les folates.

1.3 Diffusion des molécules hydrosolubles à partir des haricots verts

1.3.1 Diffusion des folates

1.3.1.1 Données brutes

Comme pour les épinards, la concentration en folate a été déterminée dans les haricots verts à chaque point de prélèvement par HPLC avec détection en fluorimétrie. Les concentrations en folates totaux sont exprimées en mg.kg^{-1} de matière fraîche, en équivalent 5- $\text{CH}_3\text{-H}_4$ folate monoglutamate. Les concentrations en folate dans les haricots verts au cours du temps sont présentées dans la Figure 54.

La concentration en folates au temps t_0 est du même ordre (environ $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ exprimée en matière fraîche) pour les deux pH et les trois températures étudiées. La concentration en folates diminue bien dans les haricots verts au cours des 4 h de diffusion. Cette diminution est beaucoup plus dépendante de la température. Ainsi, à pH 5 et 25°C la teneur en folates est quasiment stable. Elle diminue en revanche à 45°C et encore plus à 65°C . Ici encore la décroissance semble avoir une forme exponentielle avec un plateau au-delà de 120 min, au moins à 65°C .

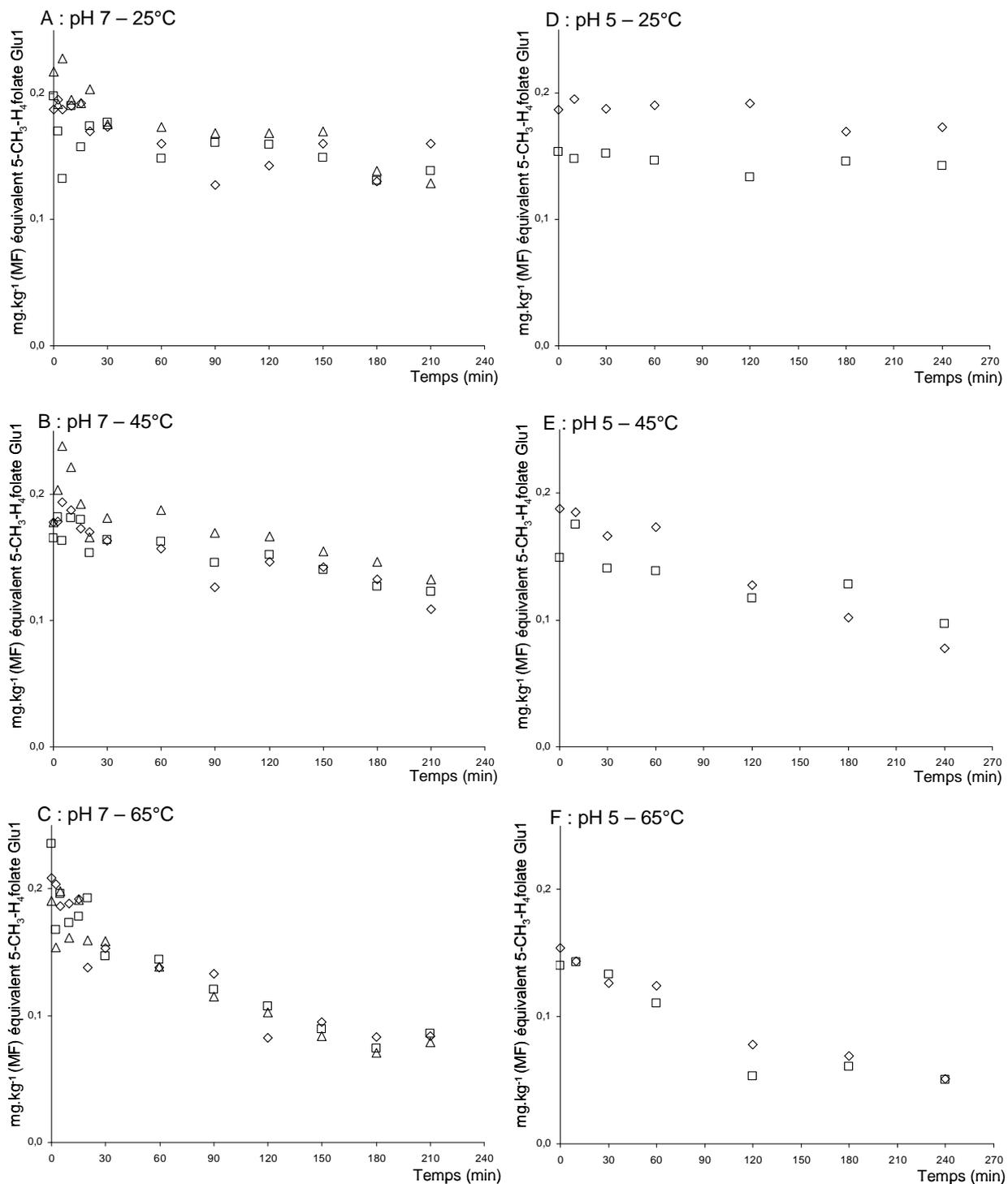


Figure 54 : Concentrations en folate (équivalent 5-CH₃-H₄folate monoglutamate) au cours du temps dans les haricots verts des cinétiques de diffusion à pH 7 et 5 et aux trois températures étudiées.

◇ : Lot 1 ; □ : Lot 2 ; △ : Lot 3

1.3.1.2 Modélisation

Comme pour les épinards, la modélisation de la diffusion des folates à partir de haricots verts a été réalisée à l'aide de la deuxième loi de Fick.

La modélisation a été réalisée de la même façon pour chaque condition de pH et de température étudiées. Cependant, je ne présenterai dans ce paragraphe qu'un exemple pour une condition où la diminution des concentrations est suffisamment marquée pour permettre de juger de l'ajustement. Les modélisations de l'ensemble des données, pour chaque condition, sont présentées en Annexe.

L'exemple choisi est celui de la modélisation de la diffusion des folates du lot 1 à pH 7 et à 65 °C. Les données expérimentales montrent que la diffusion des folates a lieu au cours des premières 120 minutes, jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Le C_{∞} a donc été déterminé comme la moyenne des concentrations en folate entre 120 et 240 min.

Le résultat du modèle obtenu pour la diffusion des folates à partir des haricots verts du lot 1 à pH 7 et à 65 °C est présenté dans la Figure 55.

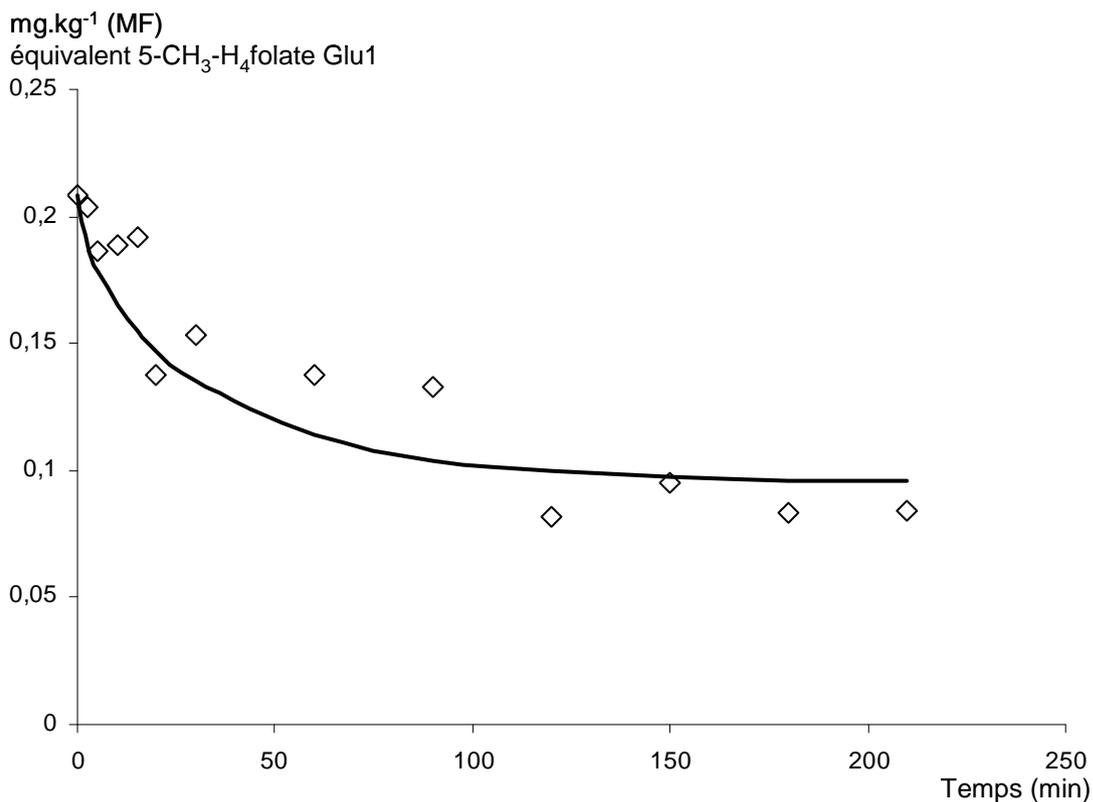


Figure 55 : Modélisation de la cinétique de diffusion des folates à partir des haricots verts du lot 1 à pH 7 et à 65 °C

◇ : Données expérimentales ; — : Modèle de diffusion

Le modèle de Fick obtenu semble ici aussi être satisfaisant. La forme exponentielle de la courbe est en accord avec les résultats expérimentaux que nous avons obtenus. Dans cet

exemple, le coefficient de corrélation obtenu est de 0,98, la valeur du coefficient de corrélation confirme donc que le modèle de Fick est bien adapté à la modélisation des données. A partir de ce modèle, la constante de diffusivité des folates a été déterminée, dans cet exemple elle est de $8,0.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$.

1.3.1.3 Constantes de diffusivité et quantités résiduelles des folates à partir des haricots verts

Les constantes de diffusivité ainsi que la quantité résiduelle en folates dans les haricots verts, pour les deux pH (7 et 5) et les trois températures (25 °C, 45 °C et 65 °C), et les coefficients de corrélation associés sont présentés dans le Tableau 39.

Tableau 39 : Constantes de diffusivité et quantité résiduelle des folates à partir des haricots verts

pH	Température	Lot	D ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	r ²	Moyenne	C _∞ / C ₀	Moyenne
7	25 °C	1	$6,0.10^{-10}$	0,99	$7.3.10^{-10}$	0,75	0,73
		2	$8,0.10^{-10}$	0,98		0,75	
		3	$8,0.10^{-10}$	0,99		0,69	
	45 °C	1	$7,0.10^{-10}$	0,99	8.10^{-10}	0,70	0,70
		2	$7,0.10^{-10}$	0,99		0,76	
		3	$1,0.10^{-09}$	0,98		0,65	
	65 °C	1	$8,0.10^{-10}$	0,98	6.10^{-10}	0,46	0,41
		2	$6,0.10^{-10}$	0,98		0,38	
		3	$4,0.10^{-10}$	0,98		0,39	
5	25 °C	1	∅	∅	∅	1,02	1,16
		2	∅	∅		1,31	
	45 °C	1	$4,0.10^{-10}$	0,97	$5,0.10^{-10}$	0,53	0,59
		2	$6,0.10^{-10}$	0,98		0,65	
	65 °C	1	$3,0.10^{-10}$	0,98	$3,0.10^{-10}$	0,43	0,43
		2	$3,0.10^{-10}$	0,97		0,43	

∅ : non déterminé

Pour l'ensemble des conditions de pH et de température étudiées, la constante de diffusivité des folates à partir des haricots verts est du même ordre, $10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. Cependant, elles apparaissent très variables entre les lots pour une même condition. En effet, la pente faible de ces diminutions de concentration ne permet pas de distinguer un effet significatif du pH ou de la température. La constante de diffusivité calculée pour les haricots verts est 100 fois plus

élevée que celle calculée pour les épinards. Il apparait donc que la vitesse de diffusion des folates est plus élevée pour les haricots verts que pour les épinards.

La quantité résiduelle en folates dans les haricots verts est du même ordre à pH 7 entre les températures 25 et 45 °C. Par contre, elle diminue à 65 °C. A pH 5, la quantité résiduelle en folates dans les haricots verts diminue avec l'augmentation de la température. Il semble donc que la température, mais pas le pH, ait un effet sur la quantité résiduelle en folates dans les haricots verts.

1.3.1.4 Diffusion des dérivés de folates

La concentration des différents dérivés de folates a été déterminée par LC-MS dans les échantillons au temps zéro et au temps final de l'expérience. Les concentrations en mg.kg⁻¹ exprimées par rapport à la matière fraîche des différents dérivés dans les haricots verts sont présentées dans le Tableau 40.

Tableau 40 : Concentrations des dérivés de folates à t₀ et t_∞ (mg.kg⁻¹) dans les haricots verts

pH	°C	Temps	5-CH ₃ - H ₄ folate	5-HCO- H ₄ folate	10- HCO- PteGlu	H ₄ folate	PteGlu	5,10- CH ⁺ - H ₄ folate	10- HCO- H ₂ folate	Somme (équivalent acide folique)	C/C ₀ HPLC- Fluo
7	25	t ₀	0,543	0,13	0,042	0,028	0,66	0,008	0,020	1,404	0,75
		t ₂₁₀	0,353	0,07	0,038	0,005	0,001	0,002	0,014	0,465	
		C/C ₀	0,65	0,54	0,91	0,18	0,21	0,28	0,69	0,33	
	45	t ₀	0,517	0,06	0,058	0,016	0,002	0,003	0,026	0,651	
		t ₂₄₀	0,216	0,04	0,043	0,009	0,002	0,003	0,015	0,315	
		C/C ₀	0,43	0,41	0,73	0,73	0,81	1,02	0,56	0,48	
	65	t ₀	0,330	0,06	0,060	0,009	0,001	0,002	0,020	0,463	
		t ₂₄₀	0,027	0,04	0,039	0,007	0,002	0,006	0,012	0,128	
		C/C ₀	0,08	0,67	0,65	0,80	2,35	2,36	0,59	0,28	
5	25	t ₀	0,342	0,07	0,032	0,014	0,001	0,002	0,009	0,449	1,16
		t ₁₈₀	0,362	0,07	0,036	0,005	0,001	0,002	0,013	0,464	
		C/C ₀	1,05	0,97	1,13	0,35	0,74	1,10	1,37	1,03	
	45	t ₀	0,541	0,07	0,039	0,012	0,001	0,003	0,021	0,661	
		t ₂₄₀	0,112	0,05	0,037	0,008	0,002	0,000	0,007	0,210	
		C/C ₀	0,20	0,74	0,92	0,63	1,38	0,10	0,35	0,32	
	65	t ₀	0,448	0,09	0,040	0,014	0,001	0,003	0,013	0,582	
		t ₂₄₀	0,008	0,05	0,048	0,003	0,001	0,000	0,004	0,104	
		C/C ₀	0,01	0,52	1,20	0,22	0,92	0,04	0,27	0,18	

Le principal dérivé présent dans les haricots verts est le 5-CH₃-H₄folate, dont la proportion représente entre 30 et 80 % des folates totaux. La quantité résiduelle du 5-CH₃-H₄folate diminue en fonction de la température et ce aux deux pH étudiés. Il semblerait que la quantité résiduelle soit plus élevée pour le pH 7 que pour le pH 5. Les dérivés présentant un groupement formyle (5-HCO-H₄folate et 10-HCO-PteGlu) représentent entre 10 et 40 % des folates totaux. La quantité résiduelle du 5-HCO-H₄folate semble être liée à la température que pour le pH 5. A pH 7, La quantité résiduelle du 5-HCO-H₄folate est du même ordre. En revanche, pour le 10-HCO-PteGlu, la quantité résiduelle n'est pas influencée par la température à pH 5 alors qu'il semblerait y avoir une diminution en fonction de la température à pH 7. De plus, la quantité résiduelle du 10-HCO-PteGlu est plus élevée à pH 7 qu'à pH5, notamment à 65 °C.

Pour les dérivés mineurs, les teneurs initiales sont soit faibles et très variables (H₄folate et 10-HCO-H₂folate) soit très faibles (PteGlu et 5,10-CH⁺-H₄folate), il n'est donc pas possible de conclure avec certitude.

Comme pour les épinards, la quantité résiduelle observée après dosage par HPLC avec une détection en fluorimétrie est supérieure à celle observée pour la somme de tous les dérivés. Ceci tend à confirmer la présence de produits de dégradation dosés en HPLC avec la méthode de dosage des folates totaux.

1.3.2 Diffusion des sures

Comme pour les épinards, nous avons suivi la diffusion des sucres et acides à partir de haricots verts cuits. La modélisation de la diffusion des sucres et acides pour les haricots verts a été réalisée à l'aide de l'Equation 7.

La modélisation a été réalisée sur la moyenne des trois lots pour le pH 7 et des deux lots pour le pH 5, aux trois températures. Le modèle a été ajusté et le coefficient de corrélation calculé. Le modèle a été validé lorsque le coefficient r^2 était le plus élevé.

Les constantes de diffusivité calculées par le modèle de diffusion, les coefficients de corrélation associés, ainsi que les teneurs résiduelles en sucres et acides dans les haricots verts à la fin de la diffusion sont présentés dans le Tableau 41.

La diffusion des sucres (glucose, fructose et saccharose) à partir des haricots verts montre une constante de diffusivité similaire pour les trois sucres étudiés et pour toutes les conditions de

pH et de température, à l'exception d'une constante de diffusivité plus élevée pour le saccharose à 25 °C à pH 5. La température et le pH ne semblent donc pas avoir d'influence sur la vitesse de diffusion du glucose, du fructose et du saccharose.

La concentration résiduelle en glucose diminue avec la température à pH 7, et entre 25 et 45 °C à pH 5. La concentration résiduelle en fructose dans les haricots verts diminue avec l'augmentation de la température à la fois à pH 7 et à pH 5. Enfin, pour le saccharose, il n'y a pas d'évolution marquée de la concentration résiduelle quels que soient la température et le pH.

Tableau 41 : Constantes de diffusivité et quantités résiduelles des sucres et acides des haricots verts

	pH	Température (°C)	D (m ² .s ⁻¹)	r ²	C _∞ /C ₀
Glucose	7	25	3,0.10 ⁻¹⁰	0,99	0,61
		45	3,0.10 ⁻¹⁰	0,99	0,52
		65	2,5.10 ⁻¹⁰	0,99	0,39
	5	25	1,7.10 ⁻¹⁰	0,99	0,71
		45	1,5.10 ⁻¹⁰	0,98	0,48
		65	1,5.10 ⁻¹⁰	0,99	0,47
Fructose	7	25	1,5.10 ⁻¹⁰	0,97	0,57
		45	1,5.10 ⁻¹⁰	0,85	0,55
		65	6,0.10 ⁻¹⁰	0,93	0,39
	5	25	3,0.10 ⁻¹⁰	0,99	0,75
		45	2,1.10 ⁻¹⁰	0,98	0,43
		65	2,0.10 ⁻¹⁰	0,99	0,38
Saccharose	7	25	1,0.10 ⁻⁰⁹	0,99	0,51
		45	2,5.10 ⁻¹⁰	0,99	0,51
		65	5,0.10 ⁻⁰⁹	0,97	0,63
	5	25	1,0.10 ⁻⁰⁷	0,95	0,61
		45	5,0.10 ⁻¹⁰	0,95	0,44
		65	5,0.10 ⁻¹⁰	0,88	0,55
Acide citrique	7	25	9,0.10 ⁻⁰⁹	0,99	0,05
		45	9,0.10 ⁻⁰⁹	0,99	0,06
		65	5,0.10 ⁻⁰⁹	0,98	0,03
	5	25	4,0.10 ⁻⁰⁹	0,93	0,07
		45	5,0.10 ⁻⁰⁹	0,97	0,06
		65	5,0.10 ⁻⁰⁹	0,97	0,06
Acide malique	7	25	1,0.10 ⁻⁰⁹	0,98	0,87
		45	5,0.10 ⁻¹⁰	0,98	0,44
		65	2,5.10 ⁻¹⁰	0,99	0,36
	5	25	5,0.10 ⁻¹⁰	0,99	0,75
		45	3,5.10 ⁻¹⁰	0,99	0,51
		65	2,0.10 ⁻¹⁰	0,99	0,48

La diffusion des acides (acide citrique et acide malique) à partir des haricots verts montre des constantes de diffusivité du même ordre pour chacun des acides en fonction de la température et du pH. Les concentrations résiduelles à la fin de l'expérience sont aussi très différentes. L'acide citrique est quasiment totalement extrait, alors que l'acide malique persiste dans les haricots verts. La température et le pH ne semblent donc pas avoir d'effet sur la vitesse de diffusion pour les deux acides étudiés. En revanche, la constante de diffusivité de l'acide citrique est plus élevée que celle de l'acide malique, la diffusion est donc plus rapide pour l'acide citrique que pour l'acide malique.

Par contre, on observe un effet de la température sur la diminution de la quantité résiduelle de l'acide malique. De plus, il semblerait que la quantité résiduelle de l'acide malique soit plus élevée à pH 5 qu'à pH 7 et ce à 45 et 65 °C.

Les constantes de diffusivité calculées pour les sucres et acides à partir de haricots verts sont du même ordre que celles calculées pour les folates à partir de la même matrice.

2. Discussion

L'étude et la modélisation de la diffusion des folates et des sucres et acides à partir d'épinards et de haricots verts cuits renseignent sur deux phénomènes :

- La vitesse relative de migration des folates vers le milieu extérieur donnée par la constante de diffusivité (D);
- Les quantités résiduelles de folate à la fin de l'expérience, donnée par le rapport entre la concentration initiale (C_0) en folate et la concentration finale (C_∞).

Globalement très peu de données sur la diffusion des molécules hydrosolubles à partir de matrices végétales telles que les épinards et les haricots verts existent. Les quelques études traitant de ce sujet concernent principalement la diffusion des sucres et acides. A ce jour, aucune étude sur la diffusion et les constantes de diffusivité des folates sont disponibles.

Friedman & Kraemer (1930) ont déterminé les constantes de diffusivité du glucose et du saccharose à partir de gels d'alginate et de gels d'agar vers l'eau. Les constantes déterminées à partir du gel d'alginate sont de $2,55 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 5 °C pour le glucose, de $2,85 \cdot 10^{-10}$ à $4,13 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ de 5 °C à 20 °C, pour le saccharose. A partir du gel d'agar, la constante de diffusivité calculée est de $2,47 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour le saccharose à 5 °C. De plus, Schwartzberg & Chao (1982) donnent les constantes de diffusivité du glucose, du fructose et du saccharose dans de l'eau à 25 °C à $0,69 \cdot 10^{-9}$ et $0,54 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Vukov & Monzpart Senyi (1977) ont déterminé les constantes de diffusivité des sucres et acides dans l'eau à partir de tranches de pomme à 75 °C. Les constantes calculées sont de $11,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour les sucres et de $14,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour les acides. Les constantes calculées pour les folates sont de l'ordre de $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour les épinards et de $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour les haricots verts. Les constantes de diffusivité des folates sont similaires à celles des sucres et acides. En revanche, celles à partir d'épinards sont plus élevées.

Les constantes de diffusivité que nous avons calculé pour les sucres et les acides sont de l'ordre de $10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à partir des épinards et de $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à partir des haricots verts. Ces constantes de diffusivité sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature pour les haricots verts. En revanche, celles des sucres et acides calculées à partir des épinards sont

inférieures à celles trouvées dans la littérature. Cependant, les constantes de diffusivité ont été calculées au cours de la diffusion des sucres et acides à partir de gel d'alginate et d'agar ou de tranche de pomme. Ces matrices sont différentes de celles que nous avons étudiées notamment au niveau des barrières physiologiques telles que la cuticule. Le système étudié par Vukov & Monzpart Senyi montre les mêmes caractéristiques de charge (parois cellulaires, acides) et des constantes de diffusion proches, avec un pH probablement plus faible (pH des pommes entre 3,5 et 4,2). Ces effets répulsifs sont donc probablement exempts. Les constantes de diffusivité que nous avons calculé sont globalement du même ordre que celles déjà publiées pour les sucres et acide. Le système que nous avons mis en place pour l'étude de la diffusion des molécules hydrosolubles comme les sucres, les acides et les folates à partir d'épinards et de haricots verts apparaît donc être efficace. Les constantes de diffusivité observées pour les folates sont du même ordre que pour les sucres et acides, avec le même différentiel entre les deux matrices.

2.1 Impact du pH sur la diffusion des molécules hydrosolubles

Les constantes de diffusivité que nous avons calculé pour les folates à partir d'épinards et de haricots verts sont de l'ordre de 10^{-12} et 10^{-10} $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement, à la fois à pH 7 et à pH 5. Les constantes de diffusivité calculées pour les sucres et acides sont également du même ordre pour les deux pH étudiés. Il semble donc que le pH n'ait pas d'effet sur la diffusion des folates et des sucres et acides à partir des épinards et des haricots verts.

A pH 5 et à pH 7, la charge électrique des acides est négative, ainsi que celle des parois cellulaires. On peut donc supposer l'existence de répulsions électrostatiques entre les parois cellulaires et les sucres et acides, entraînant une limitation de la diffusion de ces derniers.

Pour les haricots verts, la différence entre les constantes de diffusivité de l'acide citrique et de l'acide malique est de l'ordre d'un facteur 10, alors qu'ils sont a priori de taille et de charge similaires dans ces conditions. Cette différence pourrait être due à la nature des sels qui les neutralisent, l'acide citrique ayant en particulier une plus grande capacité à complexer les cations divalents.

La diffusion des folates à partir des épinards et des haricots verts, n'est pas influencée par le pH. A pH 5 et à pH 7, la charge électrique globale des folates est négative (Zhao *et al.*, 2009). Il semble donc que les hypothèses décrites pour les sucres et acides soient transposables aux folates, notamment les effets de répulsions électrostatiques avec les parois. De plus, les

interactions des folates avec des macromolécules telles que les protéines sont bien décrites, ces interactions pouvant limiter la diffusion des folates dans ces conditions de pH.

Le pH ne semble donc pas être le principal paramètre physico-chimique impliqué dans la cinétique de la diffusion des sucres, des acides et des folates.

2.2 Impact de la température sur la diffusion des molécules hydrosolubles

L'étude de la diffusion des molécules hydrosolubles (sucres, acides et folates) en fonction de la température a montré que celle-ci n'a pas d'effet majeur sur la vitesse de diffusion des molécules quelle que soit la matrice végétale considérée mais par contre a un effet sur la quantité résiduelle, et ce notamment dans le cas des folates.

Les teneurs résiduelles en folates sont plus faibles pour les épinards (20 % à pH 7 et 10 à 30 % à pH 5) que pour les haricots verts (40 à 70 % à pH 7 et 40 à 60 % à pH 5). On a donc plus de folates extrait des épinards que des haricots verts. La constante de diffusion plus élevée dans les haricots verts ne compare pas les effets de l'épaisseur et de la forme sur le bilan d'extraction.

Les épinards et les haricots verts sont deux tissus différents, une feuille et une gousse respectivement. Les feuilles d'épinards sont composées de deux couches, chacune ayant seulement quelques assises cellulaires. En revanche, les haricots verts sont des gousses composées d'un parenchyme et de graines, deux structures histologiquement différentes. L'existence de ces différents compartiments et la possibilité que les folates soient retenus dans ces compartiments via des liaisons avec des macromolécules impliquerait qu'une partie des folates diffuse très rapidement et l'autre serait plus retenue dans la matrice entraînant une faible teneur résiduelle et une vitesse de diffusion plus faible. Dans les haricots verts, l'existence d'une compartimentation des folates dans le parenchyme et dans les graines est clairement établie. La concentration en folates dans le parenchyme est de $0,252 \text{ mg.kg}^{-1}$, alors qu'elle est trois fois plus élevée dans les graines avec une concentration de $0,709 \text{ mg.kg}^{-1}$.

2.3 Evolution des proportions des vitamines au cours de la diffusion

Le principal dérivé rencontré à la fois dans les épinards et les haricots verts est le 5-CH₃-H₄folate. Il présente dans tous les cas (épinards et haricots verts, pH 5 et 7) des C_{∞}/C_0 faibles. Il en est de même pour les 5-HCO-H₄folate et le 10-HCO-PteGlu. Ces dérivés étant plus stables à pH 5 qu'à pH 7, on ne peut donc pas exclure le fait que ces dérivés ont été dégradés au cours du temps, diminuant la concentration finale et donc induisant une augmentation de la quantité totale extraite.

2.4 Conclusion

Le modèle de diffusion nous a permis de déterminer les constantes de diffusivité des folates à pH 5 et à pH 7 pour trois températures. De plus, nous avons déterminé les teneurs résiduelles pour l'ensemble des conditions étudiées. Cependant, les folates étant des molécules sensibles à l'oxygène et aux traitements thermiques, il est donc nécessaire de prendre en compte dans le modèle de diffusion les paramètres de dégradation thermique et d'oxydation des folates.

Chapitre 6 :

Dégradation thermique des folates en solution modèle et dans les purées : le réacteur instrumenté

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié la diffusion des folates à partir d'épinards et de haricots verts cuits. Cependant, l'étude de la diffusion a été menée à des températures où les folates peuvent subir une dégradation thermique, notamment à 45 et à 65 °C.

C'est pourquoi, afin de prendre en compte la part de la dégradation thermique dans les cinétiques de diffusion, des cinétiques de dégradation thermique ont été réalisées. Ces cinétiques ont été faites en présence de 21 % d'oxygène (oxygène atmosphérique), pour trois températures, 45, 65 et 85 °C à partir de purées d'épinards et de purées de haricots verts.

Les concentrations en folates dans les échantillons prélevés au cours du temps ont été déterminées par HPLC avec une détection en fluorimétrie. Elles sont exprimées en mg.kg^{-1} de matière fraîche en équivalent acide folique.

1. Dégradation des folates en présence d'oxygène à 21 %

1.1 Epinards

Les évolutions de la concentration en folates, pour chaque lot aux différentes températures, sont présentées dans la Figure 56.

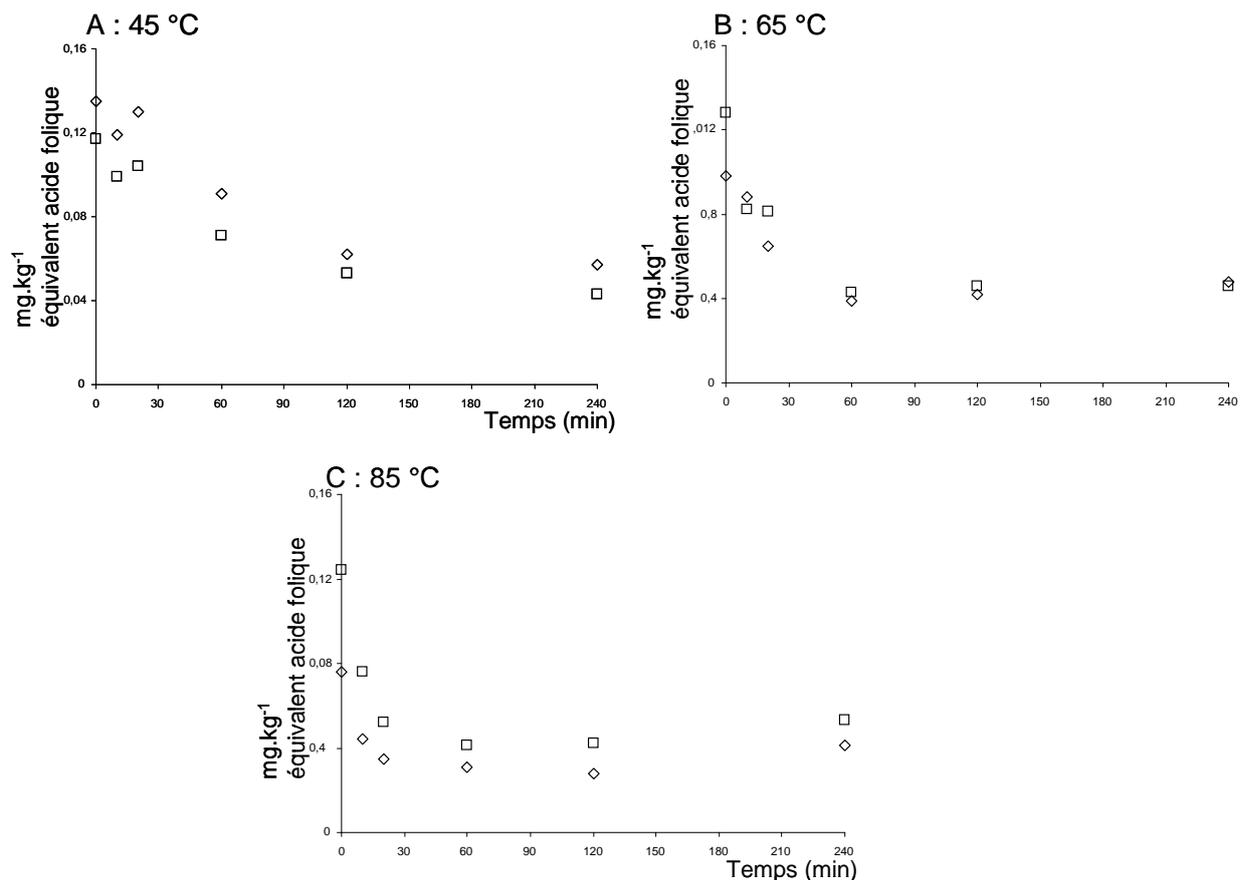


Figure 56 : Evolution des folates totaux dans les purées d'épinards

◇ : Lot 1 ; □ : Lot 2

Pour chaque température, la concentration en folates diminue au cours du temps, avec l'apparition d'un plateau à 120 min à 45°C, 60 min à 65 °C et 30 min à 85°C. Cependant, cette décroissance n'est pas monotone, la concentration augmente entre 10 et 20 min, à 45 °C. L'écart des concentrations entre les deux lots pour chaque température est relativement faible.

La dégradation des folates aux trois températures étudiées n'est pas complète, un plateau est atteint pour des rapports C_{∞}/C_0 de 40 % à 45 °C, 42 % à 65 °C et 48% à 85 °C. Ces valeurs sont supérieures aux concentrations résiduelles observées au cours des cinétiques de diffusion (30 % à 45 °C et 38 % à 65 °C).

Afin de déterminer les constantes de vitesse de la réaction, les cinétiques de dégradation thermique peuvent être modélisées à l'aide des lois classiques de cinétique chimique.

Dans la littérature, la cinétique de dégradation thermique des folates est classiquement décrite comme suivant une loi d'ordre 1. Nous avons donc d'abord linéarisé les cinétiques de dégradation des folates dans les purées d'épinards à l'aide de l'Equation (10) décrivant la loi

d'ordre 1 (Figure 57). La linéarisation a été faite à partir de la moyenne des concentrations des deux lots.

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kt$$

Équation 10

Où C est la concentration au temps t , C_0 la concentration initiale et k la constante de vitesse

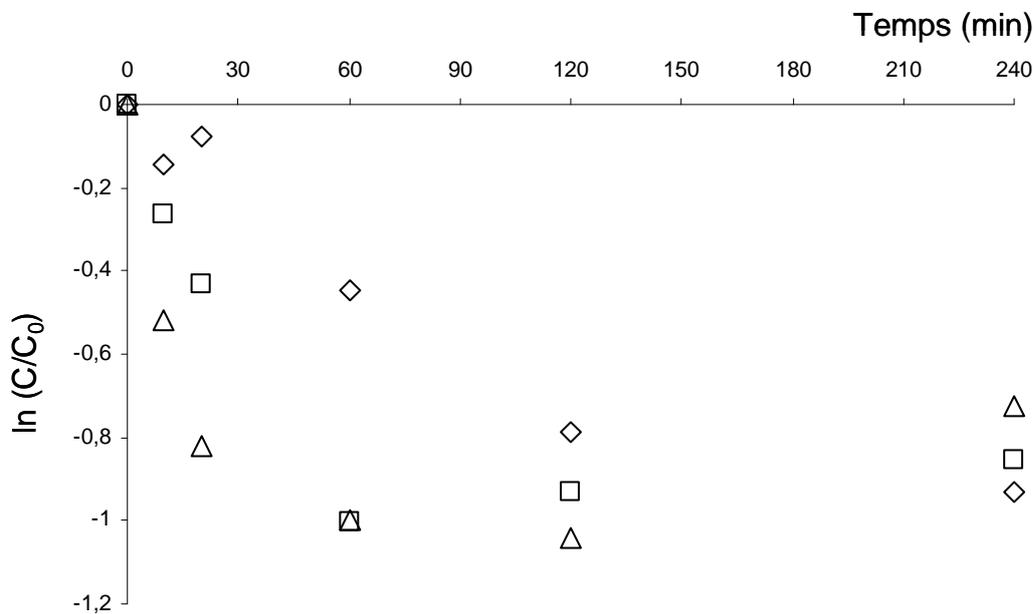


Figure 57 : Linéarisation des cinétiques de dégradation des folates dans les épinards selon une cinétique d'ordre 1

◇ : 45 °C ; □ : 65 °C ; △ : 85 °C

La représentation du $\ln(C/C_0)$ en fonction du temps n'apparaît pas linéaire, même dans la zone précédant le plateau. La cinétique de dégradation des folates dans les épinards ne suit donc pas une loi d'ordre 1.

La deuxième loi classiquement utilisée pour la modélisation des cinétiques de dégradation thermiques des composés chimiques est la loi d'ordre 2.

Nous avons donc aussi tenté de linéariser les résultats obtenus à l'aide de l'Equation (11) de dégradation d'ordre 2 (Figure 58).

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt$$

Équation 11

Où $[A]$ est la concentration au temps t , $[A]_0$ la concentration initiale et k la constante de vitesse.

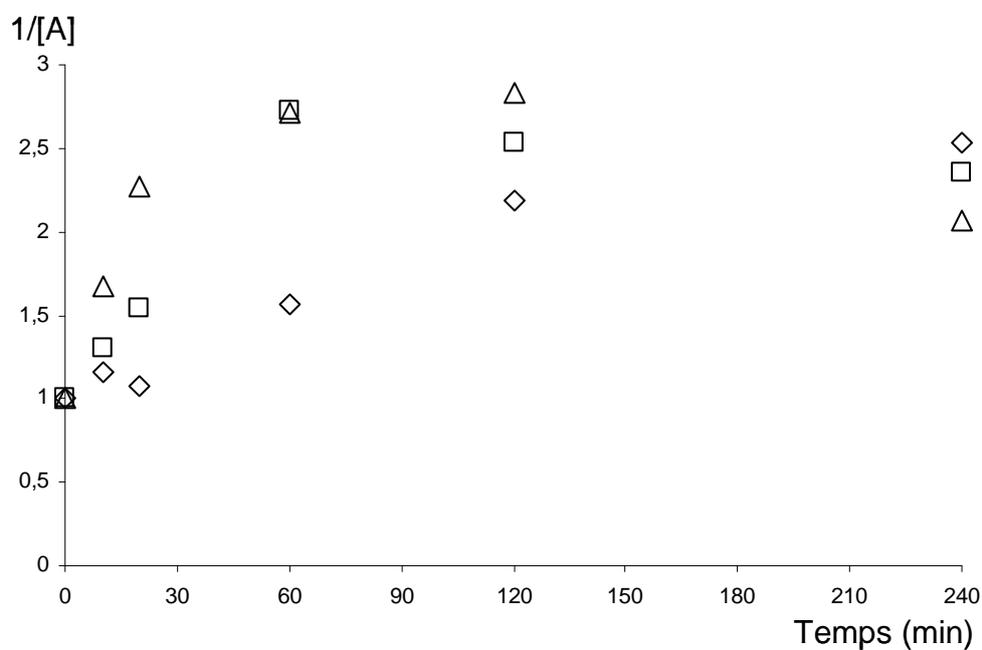


Figure 58 : Linéarisation des cinétiques de dégradation des folates dans les épinards selon une cinétique d'ordre 2
 ◇ : 45 °C ; □ : 65 °C

Comme pour la modélisation de la cinétique avec la loi d'ordre 1, le rapport $1/[A]$ en fonction du temps ne donne pas de droite évidente. La cinétique de dégradation des folates dans les purées d'épinards ne suit pas une loi d'ordre 2.

1.2 Haricots verts

Les évolutions de la concentration en folates au cours du temps, pour chaque lot aux différentes températures étudiées, sont présentées dans la Figure 59.

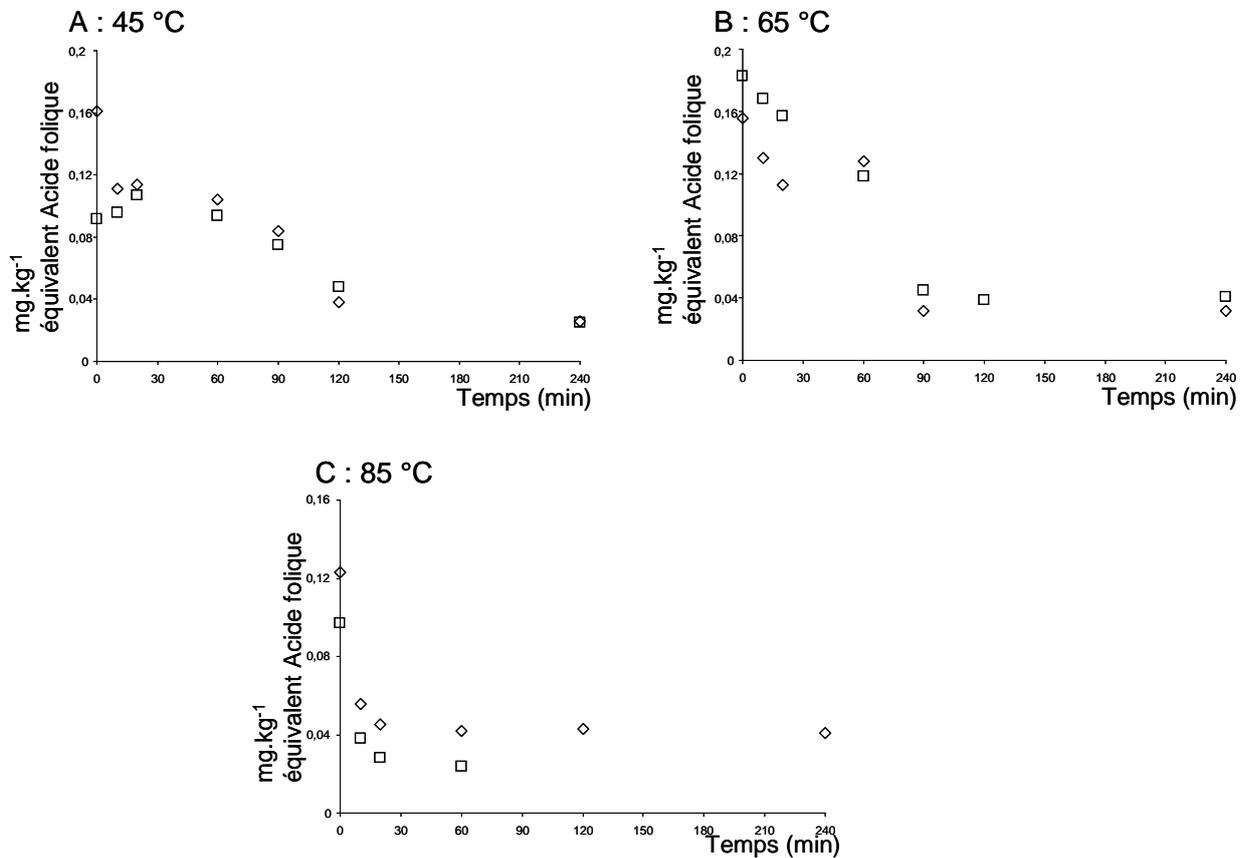


Figure 59 : Dégradation des folates totaux dans les purées de haricots verts

◇ : Lot 1 ; □ : Lot 2

L'évolution de la concentration en folates à 45 °C montre une augmentation de celle-ci dans les 20 premières minutes, plus marquée pour le lot 2. S'en suit une diminution de la concentration jusqu'à la formation d'un plateau à 120 minutes (Figure 59A). A 65 °C (Figure 59B) la décroissance des concentrations est monotone, sauf pour le point à 60 min, et ce pour les deux cinétiques indépendantes. A 85 °C (Figure 59C), on observe une diminution de la concentration en folates au cours du temps. Cette diminution atteint un plateau à 90 minutes pour les deux lots à 65 °C et à 20 minutes pour les deux lots à 85 °C.

Le plateau est d'autant plus vite atteint que la température est élevée. La variabilité entre les lots pour chaque température est faible.

Globalement, la température a un effet sur la dégradation des folates au cours du temps, le plateau étant atteint plus rapidement à 85 °C, qu'à 65 °C ou à 25 °C.

La dégradation des folates n'est pas totale, la quantité résiduelle à la fin de la cinétique de dégradation thermique est de 20 % à 45 °C et à 65 °C. Cependant, ces concentrations résiduelles sont plus faibles que celles observées lors des cinétiques de diffusion à pH 5 (59 % à 45 °C et 43 % à 65 °C), pH équivalent à celui des purées de haricots verts utilisées ici.

Comme pour les épinards, les données ont été linéarisées pour tenter d'identifier l'ordre des cinétiques, et comme pour les épinards, ces linéarisations ont conduit à exclure l'ordre 1 et l'ordre 2.

1.3 Conclusion

La cinétique de dégradation thermique des folates dans les épinards et les haricots verts en présence d'oxygène atmosphérique ne suit ni une cinétique d'ordre 1 ni une cinétique d'ordre 2. Pour les épinards et les haricots verts, pour toutes les températures étudiées, un plateau apparaît plus ou moins rapidement, indiquant une dégradation partielle des folates au sein de la matrice. De plus, dans les cinétiques à 45 °C on observe une légère augmentation de la concentration en folates aux temps courts, celle-ci étant plus marquée pour les haricots verts.

Deux possibilités peuvent expliquer ce résultat :

- Une réaction impliquant un deuxième substrat, ici très vraisemblablement l'oxygène, puisque cette dégradation a été identifiée comme une oxydation dans la littérature ;
- Une évolution des différents vitamères de folates au cours de la cinétique de dégradation thermique.

Afin de vérifier l'impact de l'oxygène sur la dégradation thermique, des cinétiques ont été menées en absence d'oxygène, et d'autres en présence d'une teneur de 40 % d'oxygène, sur des purées d'épinards et de haricots verts, afin de vérifier le rôle et d'exacerber l'effet de l'oxygène. Dans un même temps, l'évolution des différents dérivés au cours de ces

dégradations thermiques a été déterminée par dosage avec dilution d'isotope stable et détection en LC-MS.

Dans un premier temps, je vais présenter les résultats des différentes cinétiques de dégradation thermique (en absence d'oxygène et en présence de 40 % d'oxygène) puis je ferai une comparaison de celles-ci entre elles (cinétique de dégradation thermique à 21 % d'oxygène *versus* cinétique de dégradation thermique à 40 % d'oxygène).

2. Dégradation des folates en absence d'oxygène

Les cinétiques de dégradation thermique en absence d'oxygène ont été réalisées à l'aide du réacteur instrumenté. L'oxygène était absent à la fois dans les purées et dans l'espace de tête du réacteur (Tableau 42).

Pour les trois températures, les rapports C/C_0 ont été calculés : ils sont tous supérieurs à 1, ce qui signifie que les folates ne sont donc pas dégradés après 4 h de traitement thermique, à la fois dans les purées d'épinards et de haricots verts.

Tableau 42 : Conditions et résultats des incubations de purées de légumes en absence d'oxygène

Légumes	Température (°C)	Lot	t_0		Moyenne	t_{240}		Moyenne	C/C_0
			[C]	%O ₂		[C]	%O ₂		
Epinards	45	1	0,086	0,84	0,084	0,100	0,14	0,094	1,12
		2	0,081	0,70		0,088	0,24		
	65	1	0,098	1,51	0,092	0,092	1,01	0,094	1,02
		2	0,087	0,32		0,097	0		
	85	1	0,088	0,89	0,087	0,093	0,08	0,095	1,09
		2	0,086	0,21		0,096	0,11		
Haricots verts	45	1	0,122	0,87	0,118	0,140	0,59	0,120	1,02
		2	0,114	0,76		0,101	2,68		
	65	1	0,115	0,84	0,114	0,132	2,86	0,124	1,09
		2	0,112	1,13		0,116	2,32		
	85	1	0,140	2,16	0,136	0,118	2,5	0,139	1,02
		2	0,133	2,01		0,159	3,27		

[C] désigne la concentration en folate en mg.kg^{-1} en équivalent acide folique

La température seule en absence d'oxygène ne semble donc pas causer de dégradation des folates.

3. Dégradation des folates en présence de 40 % d'oxygène

Les cinétiques de dégradation thermique ont été réalisées à l'aide du réacteur instrumenté. Tout au long de l'expérience, un flux d'un mélange oxygène (40 %) – azote (60%) a été injecté dans le réacteur. La concentration en folates dans les purées d'épinards et de haricots verts a été déterminée pour chaque point de la cinétique par dilution d'isotope stable et détection en LC-MS. Les concentrations en folates totaux sont exprimées en mg.kg^{-1} en équivalent acide folique.

3.1 Epinards

Pour les épinards, les concentrations en folates déterminées pour les cinétiques de dégradation thermique à 45 °C sont présentées en Figure 60A et celles pour les cinétiques à 65 °C en Figures 60B.

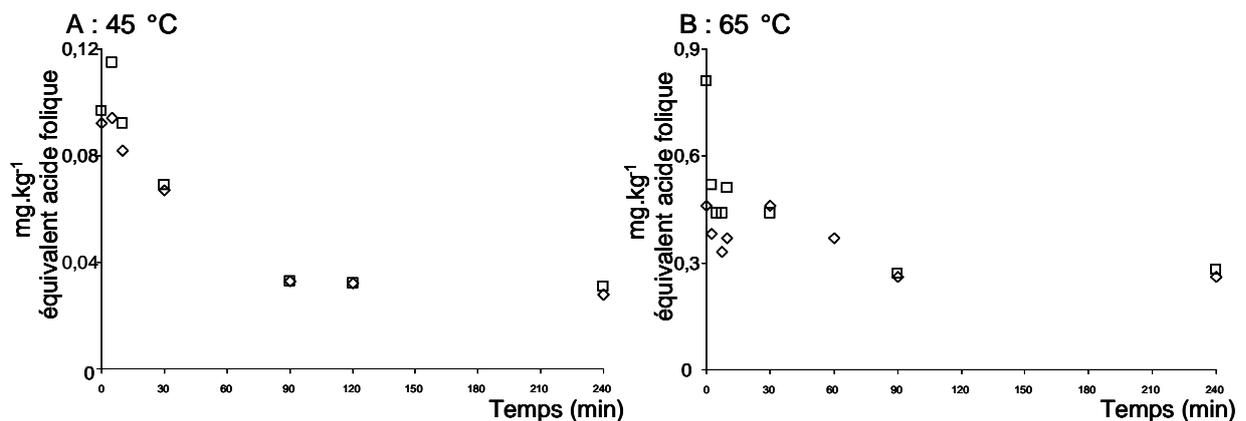


Figure 60 : Evolution de la concentration en folates totaux en présence de 40 % d'oxygène

◇ : Lot 1; □ : Lot 2

A 45 °C on observe une diminution de la concentration en folate avec l'apparition d'un plateau à 90 min. A 65 °C, la diminution de la concentration en folate est similaire de celle à 45 °C avec l'apparition d'un plateau à 90 min. Pour chaque température étudiée, les concentrations en folates sont relativement proches pour chacun des points de la cinétique, entre les deux lots. Cependant, les phases initiales des deux cinétiques ne montrent pas un comportement monotone. Ainsi, à 45 °C la concentration en folate semble augmenter au cours des 5 premières minutes, comme observée dans les cinétiques avec 21 % d'oxygène, tandis

qu'à 65 °C, après une décroissance initiale marquée, une augmentation est observée entre 10 et 30 min.

La comparaison des rapports C/C_0 (Figure 61) montre un croisement des cinétiques à 45 °C et à 65 °C à 30 min. Pour les temps longs, proportionnellement moins de folates semblent être dégradés pour la température la plus élevée.

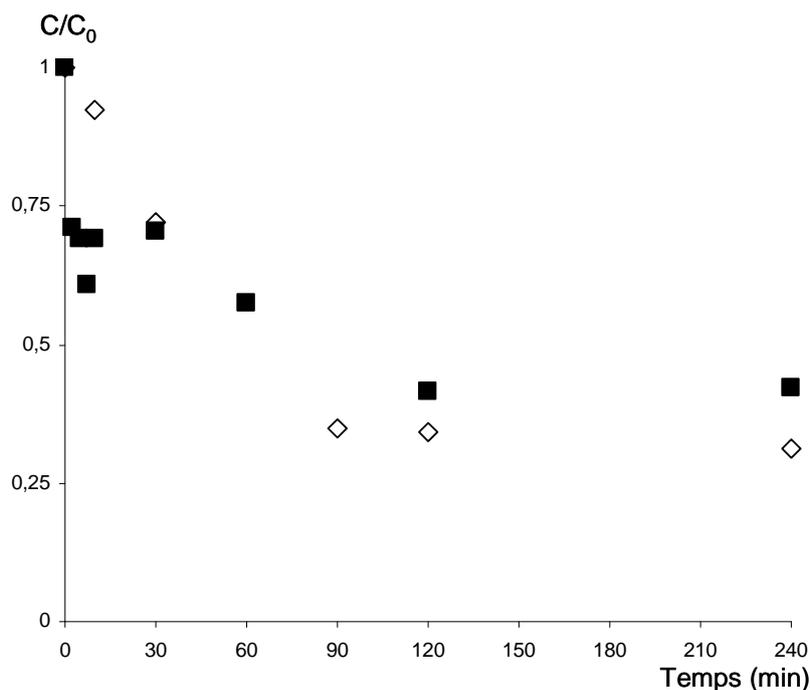


Figure 61 : Evolution du rapport C/C_0 en fonction de la température, à 40 % d'oxygène
 ◇ : 45 °C ; ■ : 65 °C

La quantité résiduelle en folates dans les purées d'épinards, à la fin des cinétiques de dégradation thermique, sont de 30 % à 45 °C et 45 % à 65 °C. Ces quantités résiduelles sont du même ordre que celle observées dans les cinétiques de dégradation thermique avec 21 % d'oxygène (42 %) et celles observées au cours des cinétiques de diffusion (38 %) à la température de 65 °C. A 45 °C, la concentration résiduelle en folate est inférieure à celle observée à la fois pour les cinétiques de dégradation thermique en présence de 21 % d'oxygène et au cours des cinétiques de diffusion (environ 30 %).

Afin de déterminer les ordres de réactions, les données ont été linéarisées à l'aide de l'équation de cinétique de dégradation d'ordre 1 (Equation 10) et d'ordre 2 (Equation 11).

Aucune des deux linéarisations ne donne de résultats satisfaisants, même avant que le plateau soit atteint.

3.2 Haricots verts

Les concentrations en folates pour les cinétiques de dégradation thermique, à 45 et 65 °C sous 40 % d'oxygène, dans les purées de haricots verts sont présentées dans la Figure 62.

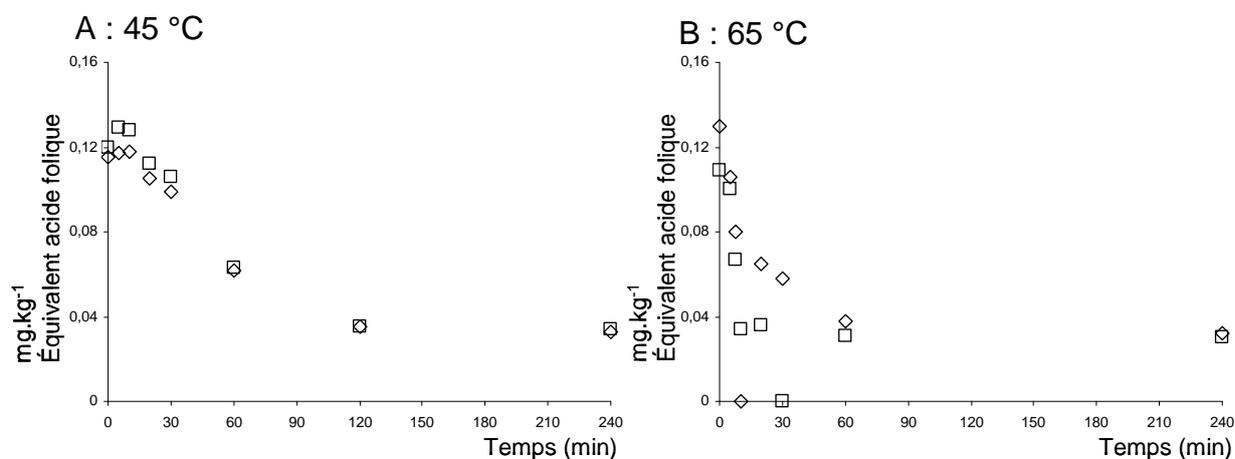


Figure 62 : Evolution de la concentration en folates totaux en présence de 40 % d'oxygène

◇ : Lot 1 ; □ : lot 2

Quelle que soit la température, on observe une diminution de la concentration en folates au cours de la cinétique en présence de 40 % d'oxygène. Il y a apparition d'un plateau à 120 min pour les cinétiques à 45 °C et à 60 min pour les cinétiques à 65 °C. Les concentrations en folates sont similaires entre les deux lots étudiés à 45 °C. En revanche, on observe une variabilité plus élevée dans la concentration en folates entre les deux lots à 65 °C.

Comme pour les épinards, et comme en présence de 21 % d'oxygène, la diminution n'est pas monotone : à 45 °C les concentrations augmentent d'abord, et à 65 °C elles augmentent également entre 10 et 30 min après une phase de décroissance rapide pour un des lots.

La modélisation de la cinétique de dégradation thermique a été réalisée à partir de la moyenne de chaque lot pour les deux températures.

La température a un effet sur la cinétique de dégradation des folates. On observe une diminution plus rapide de la concentration entre 0 et 60 min pour les cinétiques à 65 °C, qu'à 45 °C. Ceci est confirmé par la représentation du rapport C/C_0 en fonction du temps.

La teneur résiduelle en folate à la fin de l'expérience est de 28 % pour les cinétiques de dégradation réalisées à 45 °C et de 25 % pour les cinétiques de dégradation réalisées à 65 °C. Cette teneur est du même ordre que celle mesurée pour les cinétiques de dégradation thermique en présence de 21 % d'oxygène (21 % en moyenne pour les deux températures). En revanche, elle est plus faible que celle mesurée à la fin des cinétiques de diffusion, qui sont de 59 % à 45 °C et de 43 % à 65 °C.

Comme dans les cinétiques précédentes, la cinétique de dégradation thermique des folates dans les purées de haricots verts ne suit ni une loi d'ordre 1, ni une loi d'ordre 2.

4. Comparaison des cinétiques de dégradation thermique

4.1 Epinards

Les rapports C/C_0 en fonction du temps pour les cinétiques de dégradation thermique en présence de 40 % d'oxygène ou en présence de 21 % d'oxygène sont présentés en Figure 63A pour les cinétiques à 45 °C et en Figure 63B pour les cinétiques à 65 °C.

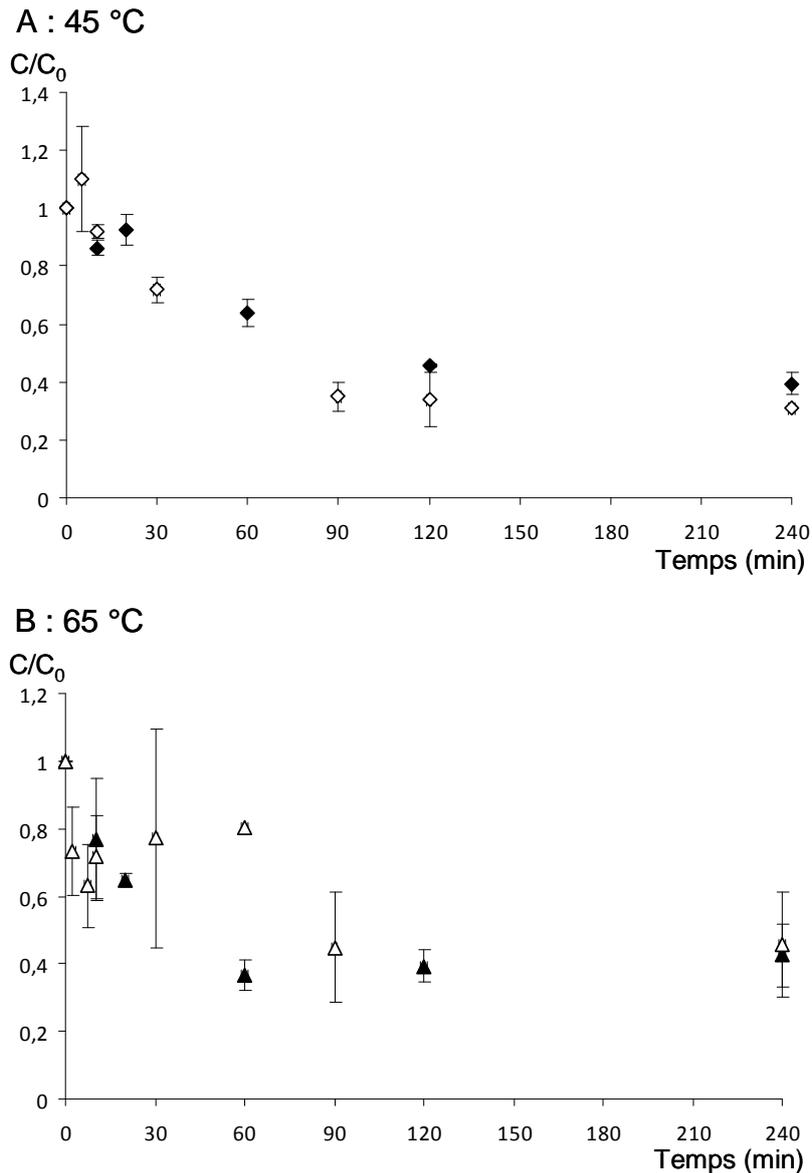


Figure 63 : Evolution des rapports C/C_0 de folates à 21 % et 40 % d'oxygène pour les épinards
 ◆ : 21 % d'oxygène ; ◇ : 40 % d'oxygène pour les cinétiques à 45 °C
 ▲ : 21 % d'oxygène ; △ : 40 % d'oxygène pour les cinétiques à 65 °C

Pour les épinards, on observe qu'à 45 °C, la dégradation des folates est similaire en présence de 21 % ou 40 % d'oxygène. Ceci est moins marqué à 65 °C, notamment en début de cinétique, mais lorsque le plateau est atteint, les concentrations en folates en présence de 21 % ou de 40 % d'oxygène sont du même ordre.

4.2 Haricots verts

Les rapports C/C_0 en fonction du temps pour les cinétiques de dégradation thermique en présence de 40 % d'oxygène ou en présence de 21 % d'oxygène sont présentés en Figure 64A pour les cinétiques à 45 °C et en Figure 64B pour les cinétiques à 65 °C.

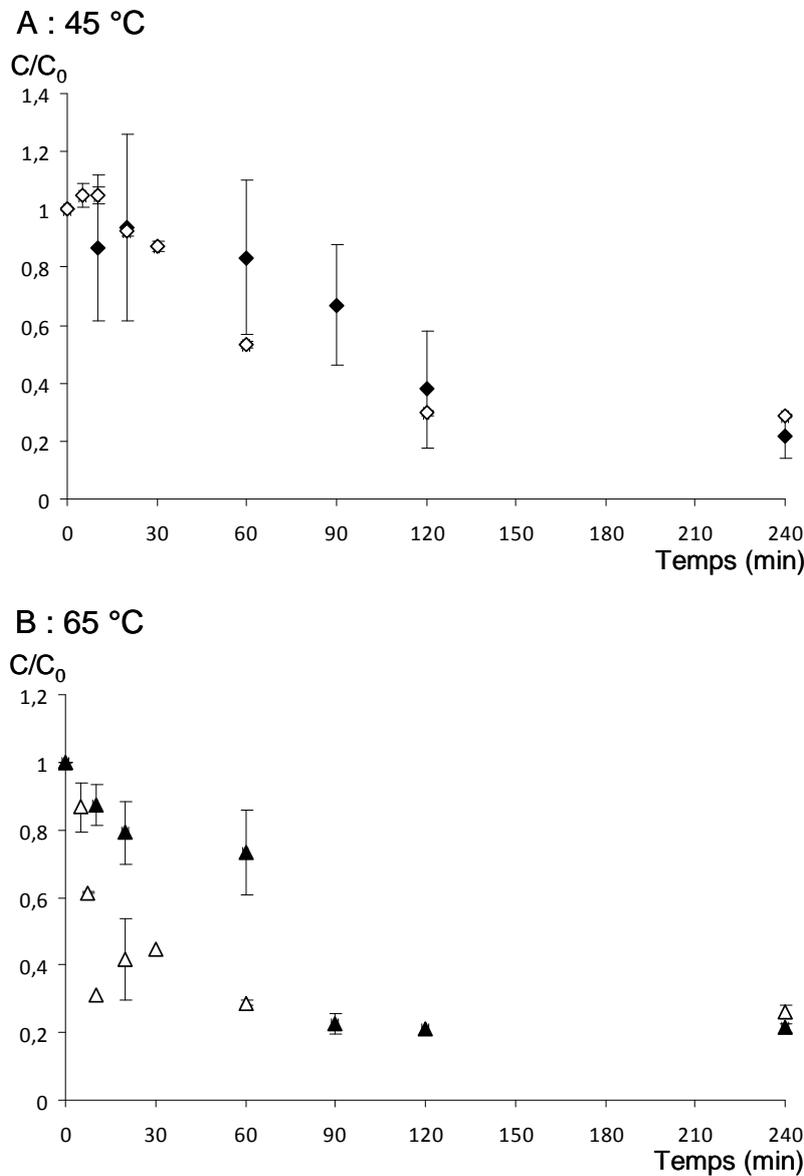


Figure 64 : Evolution des rapports C/C_0 de folates à 21 % et 40 % d'oxygène pour les haricots verts

◆ : 21 % d'oxygène ; ◇ : 40 % d'oxygène pour les cinétiques à 45 °C

▲ : 21 % d'oxygène ; △ : 40 % d'oxygène pour les cinétiques à 65 °C

A 45 °C, le profil au début de la cinétique est différent entre les deux conditions, avec un « pic » obtenu plus tard à 21 % d'oxygène. Cependant, les secondes parties des cinétiques (entre 20 et 120 min) semblent sensiblement parallèles. Enfin, au plateau les concentrations en folates sont du même ordre pour les deux conditions d'oxygène.

A 65 °C, les folates semblent être moins dégradés en présence de 21 % d'oxygène. Lorsque le plateau est atteint, les concentrations en folates sont confondues quelles que soient les conditions d'oxygène.

Quoiqu'il en soit, le doublement de la concentration en oxygène n'entraîne pas un doublement des vitesses de dégradation.

5. Conclusions

- En absence d'oxygène dans le milieu :

Les folates ne sont pas dégradés quelle que soit la température (45, 65 et 85 °C), à la fois dans les purées d'épinards et dans les purées de haricots verts.

- En présence de 21 % d'oxygène dans le milieu :

Pour les purées d'épinards, la dégradation des folates semble d'autant plus rapide en début de cinétique (avant l'atteinte du plateau) que la température est élevée. Lorsque le plateau est atteint, les concentrations en folates sont similaires pour les trois températures étudiées.

Pour les purées de haricots verts, le comportement des folates est similaire à celui observé dans les purées d'épinards, avec une dégradation d'autant plus rapide que la température est élevée. Au plateau, les concentrations sont du même ordre pour les trois températures.

En revanche, que ce soit dans les purées d'épinards ou dans les purées de haricots verts, les cinétiques ne sont ni d'ordre 1 ni d'ordre 2.

- En présence de 40 % d'oxygène dans le milieu :

Pour les purées d'épinards ou de haricots verts, la dégradation des folates avant l'atteinte du plateau semble plus importante à 65 °C qu'à 45 °C. Cependant, dans les deux cas il y a une augmentation de la concentration en folates en début de cinétique. Dans les deux cas, les concentrations en folates au plateau sont identiques pour les deux températures étudiées.

La modélisation des cinétiques de dégradation thermique montre qu'elles ne sont ni d'ordre 1 ni d'ordre 2 à la fois dans les purées d'épinards et de haricots verts.

- Comparaison 21 % d'oxygène vs 40 % d'oxygène :

Pour les épinards, les cinétiques de dégradation sont similaires pour l'ensemble des températures étudiées et dans les deux conditions d'oxygène. En revanche, pour les purées de haricots verts, la dégradation est moins rapide en présence de 21 % d'oxygène que de 40 %, ceci étant en grande partie lié à une augmentation apparente des concentrations en début de dégradation. Dans tous les cas, au plateau, les concentrations sont du même ordre pour les purées d'épinards et pour les purées de haricots verts.

L'oxygène semble donc bien être impliqué dans la dégradation des folates. Leur dégradation est très limitée en condition d'anaérobiose. Cependant, l'effet limité du doublement de la concentration en oxygène sur les vitesses de dégradation ne soutient pas l'hypothèse de son implication directe dans la réaction comme deuxième substrat.

Afin d'étudier l'évolution des différents dérivés au cours des cinétiques de dégradation thermique, leurs concentrations ont été déterminées par dilution d'isotope stable avec une détection en LC-MS.

6. Evolution des différents vitamères au cours des cinétiques de dégradation en présence de 40 % d'oxygène

6.1 Epinards

Trois dérivés sont majoritairement présents dans les épinards, il s'agit du 5-CH₃H₄folate, qui représente 70 % des folates totaux, du 5-HCO-H₄folate, qui représente 15 % des folates totaux et enfin du 10-HCO-PteGlu, qui représente 10 % des folates totaux. Les 5 % restant étant composés du H₄folate, de l'acide folique (PteGlu), du 5,10-CH⁺-H₄folate et du 10-HCO-H₂folate.

Le rapport C/C₀ a été calculé pour l'ensemble des dérivés pour les deux températures étudiées.

6.1.1 5-CH₃-H₄folate

Le 5-CH₃-H₄folate est le dérivé le plus dégradé au cours de la cinétique, que ce soit à 45 ou à 65 °C. Le rapport C/C₀ (en pourcentage) en fonction du temps est présenté en Figure 65.

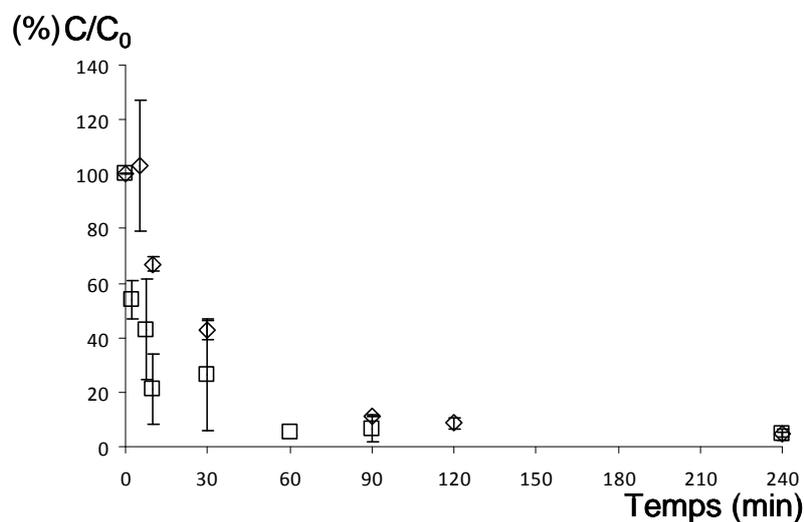


Figure 65 : Evolution du 5-CH₃-H₄folate en présence de 40 % d'oxygène
◇ : 45 °C ; □ : 65 °C

Dans les deux conditions, la dégradation de ce composé est quasiment complète au cours de l'expérience, et plus rapide à 65 °C. La dégradation a une forme exponentielle et est bien linéarisée en $\ln(C/C_0)$, c'est-à-dire en suivant un ordre 1 (Equation 10). Elle a donc été modélisée (Figure 66) selon un ordre apparent de 1, avec l'équation :

$$C = C_0 \times e^{(-kt)}$$

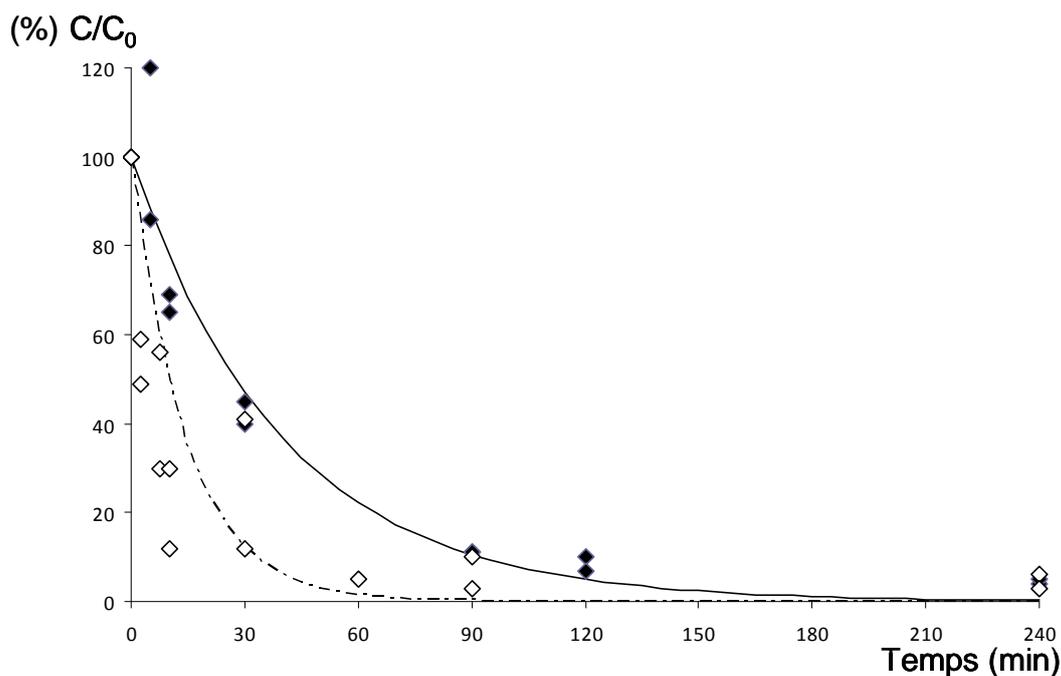


Figure 66 : Modélisation de la dégradation du 5-CH₃-H₄folate en présence de 40 % d'oxygène
 ◆ : 45 °C ; ◇ : 65 °C

Le coefficient de corrélation pour le modèle de la cinétique de dégradation à 45 °C est de 0,96 et de 0,86 pour le modèle à 65 °C. Les constantes de vitesse k obtenues sont de $25 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 45 °C et de $70 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 65 °C.

En fin de cinétique, la quantité résiduelle dans les épinards est de 4,5 % à 45 et 65 °C, quantité inférieure à celle mesurée pour les cinétiques de diffusion à 45 °C et pH 5 qui est de 14 % et celle mesurée à 65 °C qui est de 7 %.

6.1.2 5-HCO-H₄folate

L'évolution du 5-HCO-H₄folate au cours des cinétiques à 45 °C et à 65 °C est présentée en Figure 67.

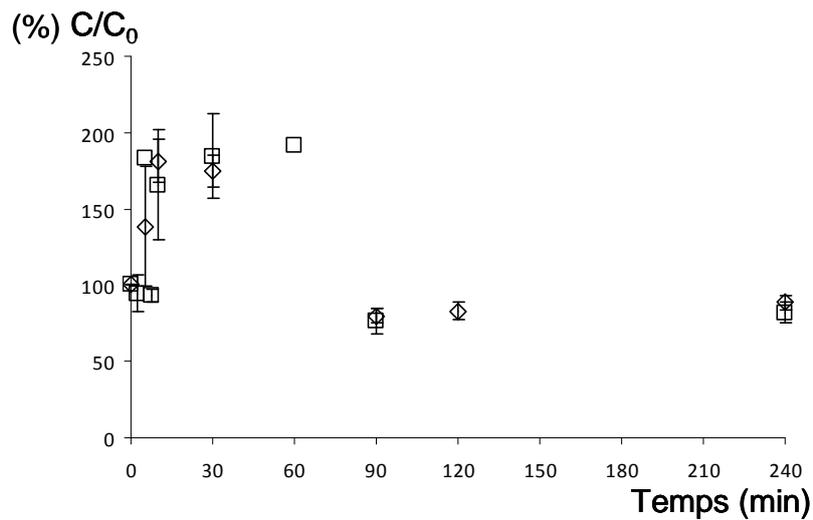


Figure 67 : Evolution du 5-HCO-H₄folate dans les purées d'épinards en présence de 40 % d'oxygène
 ◇ : 45 °C ; □ : 65 °C

La concentration en 5-HCO-H₄folate augmente dans les trente premières minutes de la cinétique à 45 °C et dans les soixante premières minutes à 65 °C puis elle diminue pour atteindre un plateau à 90 minutes pour les deux températures. Les quantités résiduelles en 5-HCO-H₄folate dans les purées d'épinards après 4h de cinétique sont en moyenne de 88 % à 45 °C et de 82 % à 65 °C, elles sont supérieures à celle obtenue dans les cinétiques de diffusion à pH 5 qui sont de 41% et de 28 % à 45 et 65 °C respectivement.

6.1.3 10-HCO-PteGlu

L'évolution du 10-HCO-PteGlu au cours des cinétiques de dégradation thermique à 45 °C et à 65 °C est présentée en Figure 68.

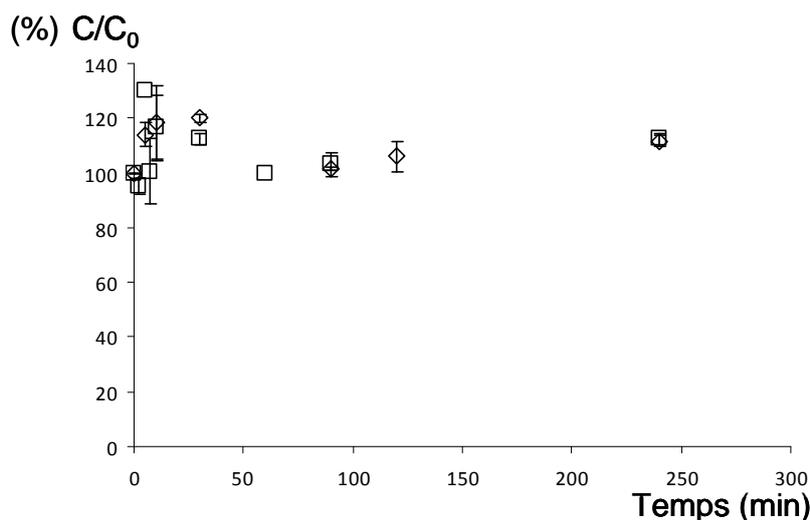


Figure 68 : Evolution du 10-HCO-PteGlu dans les épinards en présence de 40 % d'oxygène
 ◇ : 45 °C ; □ : 65 °C

Il n'y a pas de dégradation du 10-HCO-PteGlu au cours des 4h de cinétique, voire même une légère augmentation de la concentration au cours du temps.

Les quantités résiduelles calculées pour les cinétiques de dégradation thermique sont de 111 % à la fois à 45 °C et 65 °C. Ces quantités résiduelles sont du même ordre que celle obtenues à la fin des cinétiques de diffusion qui sont de 108 et 141 % à 45 et 65 °C respectivement.

6.1.4 Dérivés minoritaires

Les dérivés minoritaires présents dans les épinards au cours des cinétiques de dégradation thermique sont le H₄folate, l'acide folique, le 5,10-CH⁺-H₄folate et le 10-HCO-H₂folate. Leurs évolutions au cours des cinétiques sont présentées dans le Tableau 43. Pour ces molécules, les très faibles concentrations et la variabilité importante des concentrations initiales rendent l'interprétation moins solide.

Le comportement des 4 dérivés minoritaires est relativement contrasté ; dans la plupart des cas leurs concentrations augmentent au début de la cinétique puis diminuent en fin de cinétique. Le H₄folate montre une quantité résiduelle de 60 % à la fois à 45 et 65 °C, supérieure celle observée au cours de la cinétique de diffusion qui est de 5 % pour les deux températures étudiées. La concentration en acide folique (PteGlu) est relativement constante au cours de la cinétique de dégradation thermique, voire en légère augmentation à 65 °C. Les quantités résiduelles de l'acide folique à la fin de la cinétique de dégradation thermique sont

supérieures à celles observées au cours de la cinétique de diffusion, qui sont de 81 et 48 % à 45 et 65°C respectivement.

Tableau 43 : Evolution des dérivés minoritaires dans les épinards au cours des cinétiques en présence de 40 % d'oxygène

°C	temps	H ₄ folate	PteGlu	5,10-CH ⁺ - H ₄ folate	10-HCO-H ₂ folate
45	0	100	100	100	100
	5	120 ± 14	127 ± 5	70 ± 59	116 ± 39
	10	161 ± 55	153 ± 18	115 ± 7	425 ± 299
	30	124 ± 67	99 ± 38	105 ± 5	268 ± 178
	90	32 ± 10	153 ± 20	110 ± 25	150 ± 69
	120	49 ± 34	140 ± 24	122 ± 7	274 ± -
	240	66 ± 16	96 ± 21	70,5 ± 10	69,5 ± 46
65	0	100	100	100	100
	2,5	139 ± 57	107 ± 2	81 ± 6	150 ± -
	5	-	117 ± -	-	-
	7,5	111 ± 6	89 ± 7	125 ± 14	130 ± 65
	10	-	91 ± 7	68 ± 12	108 ± -
	30	76 ± -	103 ± 8	114 ± 26	202 ± -
	60	171 ± -	87 ± -	-	108 ± -
	90	48 ± 7	126 ± 30	100 ± 25	38 ± 9
	240	60 ± 7	111 ± 9	68 ± 21	45 ± 31

- : non déterminé

La dégradation du 5,10-CH⁺-H₄folate est du même ordre pour les deux températures. La quantité résiduelle est d'environ 70 % pour les deux températures et supérieure à celle observée pour les cinétiques de diffusion qui est d'environ 2 %.

Enfin, le 10-HCO-H₂folate est le dérivé qui présente l'augmentation de concentration la plus élevée au cours de la cinétique. La quantité résiduelle est plus élevée à 45 °C (environ 70 %) qu'à 65 °C (45 %). La quantité résiduelle du 10-HCO-H₂folate au cours des cinétiques de diffusion est plus élevée à 45 °C (124%) mais du même ordre à 65 °C (41 %) que pour les cinétiques de dégradation thermique.

6.2 Haricots verts

Les haricots verts contiennent les trois mêmes dérivés majoritaires que les épinards, dans des proportions quasi équivalentes. Le 5-CH₃H₄folate, représente 75 % des folates totaux, le

5-HCO-H₄folate représente 14 % des folates totaux et enfin le 10-HCO-PteGlu représente 8 % des folates totaux. Les 3 % restant sont composés du H₄folate, de l'acide folique (PteGlu), du 5,10-CH⁺-H₄folate et du 10-HCO-H₂folate.

Le rapport C/C₀ a été calculé pour l'ensemble des dérivés pour les deux températures étudiées, et ici aussi les dégradations des différents dérivés sont très hétérogènes.

6.2.1 5-CH₃-H₄folate

Pour les deux températures, 45 et 65 °C, on observe une diminution de la concentration en 5-CH₃-H₄folate de près de 95 % en 4 h (Figure 69).

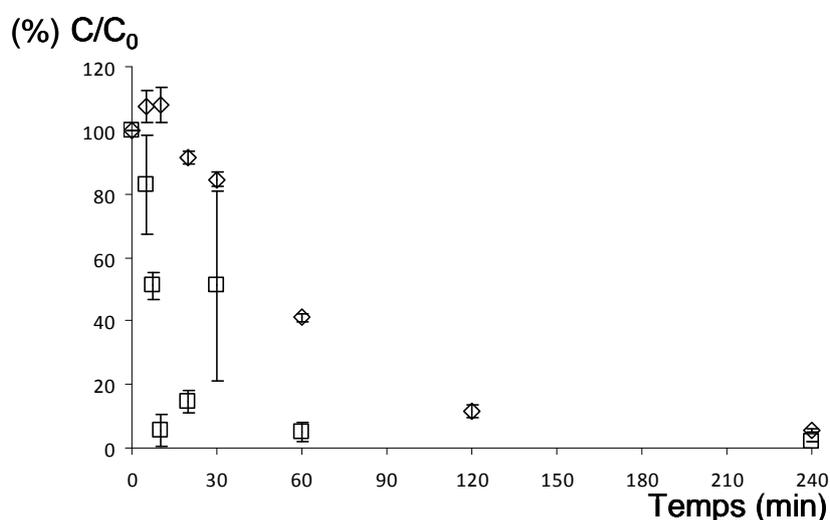


Figure 69 : Evolution du 5-CH₃-H₄folate dans les haricots verts en présence de 40 % d'oxygène
 ◇ : 45 °C ; □ : 65 °C

La dégradation de ce composé est quasiment complète au cours de l'expérience, et elle a donc été modélisée à l'aide de la loi d'ordre 1 (Equation 10). La modélisation a été effectuée à partir de la moyenne des concentrations en 5-CH₃-H₄folate pour les deux lots, à 45 et à 65 °C (Figure 70).

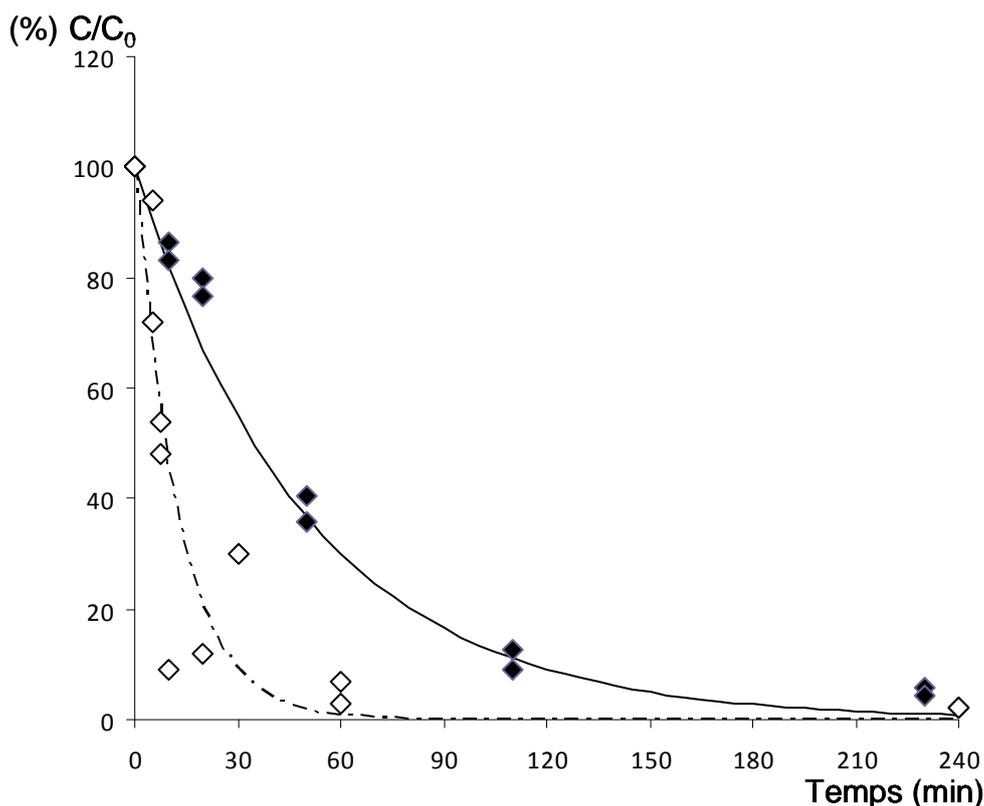


Figure 70 : Modélisation de la dégradation du 5-CH₃-H₄folate dans les haricots verts

◆ : 45 °C ; ◇ : 65 °C

La dégradation du 5-CH₃-H₄folate suit une cinétique d'ordre 1 à la fois à 45 °C et à 65°C.

Le coefficient de corrélation pour le modèle de la cinétique de dégradation à 45 °C est de 0,99, et de 0,91 pour le modèle à 65 °C. Les constantes de vitesse k obtenues sont de $20 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 45 °C et de $80 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 65 °C.

En fin de cinétique, les quantités résiduelles dans les haricots verts sont de 5,5 % à 45 °C et de 2 % à 65 °C, inférieures à celles mesurées pour les cinétiques de diffusion à pH 5 et à 45 °C qui est de 20 % mais du même ordre que celles mesurées à 65 °C qui est de 1 %.

6.2.2 5-HCO-H₄folate

L'évolution du 5-HCO-H₄folate au cours de la cinétique de dégradation thermique est présentée dans la Figure 71.

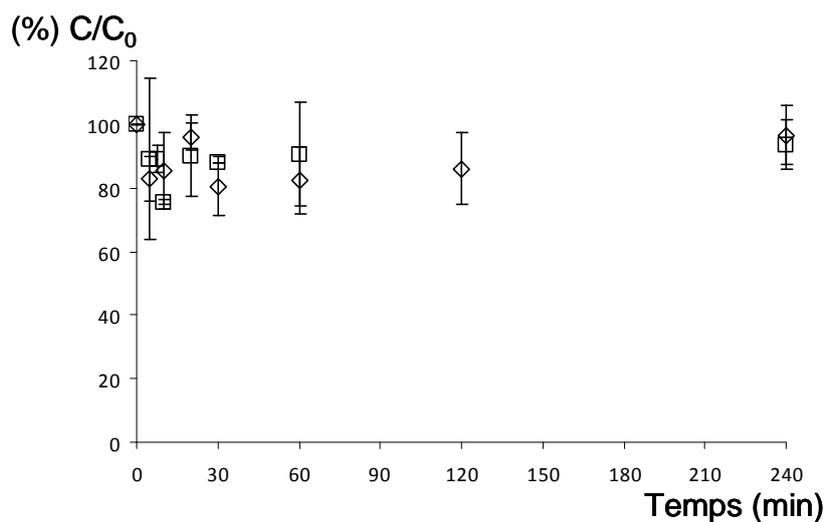


Figure 71 : Evolution du 5-HCO-H₄folate dans les haricots verts en présence de 40 %d'oxygène
 ◇ : 45 °C ; □ : 65 °C

Globalement, le 5-HCO-H₄folate est stable au cours de la cinétique de dégradation thermique, avec une légère diminution en début de cinétique (jusqu'à 30 min).

Les proportions résiduelles du 5-HCO-H₄folate sont en moyenne de 96 % à 45 °C et de 93 % à 65 °C, supérieures à celles observées au cours des cinétiques de diffusion qui sont de 74 et 52 %, à 45 et 65 °C respectivement.

6.2.3 10-HCO-H₄PteGlu

Le 10-HCO-H₄PteGlu est stable au cours de la cinétique de dégradation thermique, les rapports C/C₀ pour les cinétiques à 45 et 65 °C sont présentés dans le Tableau 44.

Tableau 44 : Evolution du 10-HCO-H₄PteGlu à 45 et 65 °C dans les haricots verts à 40 % d'oxygène

temps	45 °C				temps	65 °C			
	L1	L2	Moyenne			L1	L2	Moyenne	
0	100	100	100	± 0	0	100	100	100	± 0
5	109	105	107	± 3	5	123	84	104	± 28
10	97	110	104	± 9	7,5	102	99	101	± 2
20	109	102	106	± 5	10	90	105	98	± 11
30	99	104	102	± 4	20	106	100	103	± 4
60	97	124	111	± 19	30	101	108	105	± 5
120	107	111	109	± 3	60	126	100	113	± 18
240	110	123	117	± 9	240	109	106	108	± 2

La concentration du 10-HCO-PteGlu augmente légèrement au cours de la cinétique de dégradation thermique. La quantité résiduelle est de 117 % à 45 °C, supérieure à celles trouvées pour les cinétiques de diffusion à 45 °C (92 %). A 65 °C, la quantité résiduelle est de 108 %, inférieure à celle déterminée pour les cinétiques de diffusion (120 %).

6.2.4 Dérivés minoritaires

L'évolution des concentrations des dérivés minoritaires présents dans les haricots verts est présentée dans le Tableau 45. Comme pour les épinards, les concentrations très faibles ne permettent pas de conclusions robustes.

L'acide folique (PteGlu) et le 5,10-CH⁺-H₄folate sont stables au cours de la cinétique de dégradation thermique. La concentration en acide folique augmente au cours de la cinétique. Les quantités résiduelles de l'acide folique sont comparables à celles déterminées pour les cinétiques de diffusion, 138 % à 45 °C et 92 % à 65 °C. Pour le 5,10-CH⁺-H₄folate, les quantités résiduelles sont plus élevées à la fin de la cinétique de dégradation thermique par rapport à celles de la diffusion, 101 % et 106 % contre 10 % et 4 % à 45 et 65 °C respectivement.

Tableau 45 : Evolution des vitamères (C/C₀) minoritaires dans les haricots verts à 40 % d'oxygène

°C	temps	H ₄ folate		PteGlu		5,10-CH ⁺ - H ₄ folate		10-HCO- H ₂ folate	
45	0	100		100		100		100	
	5	103	± -	185	± 15	196	± -		-
	10	64	± -	171	± 11	59	± -		-
	20	56	± -	85	± 11	156	± 21	605	± 214
	30	127	± 73	161	± 13	50	± 70		-
	60	44	± 62	142	± 31	87	± 48		-
	120	48	± 27	67	± 18	132	± 39	465	± 140
	240	69	± 5	111	± 30	101	± 40	57	± 11
65	0	100		100		100		100	
	5	112	± 64	170	± 6	41	± 14		-
	7,5	104	± 88	91	± 23	186	± 130	349	± 86
	10		-	156	± 28	23	± -		-
	20	36	± -	93	± 13	105	± 6	225	± 109
	30	76	± 21	182	± 6	142	± 144		-
	60		-	249	± 140	80	± 27	138	± -
	240	84	± 6	120	± 8	106	± 21	38	± 19

- : non déterminé

Le H₄folate et le 10-HCO-H₂folate sont dégradés en fin de cinétique. Le taux de dégradation augmente avec la température pour le 10-HCO-H₂folate, malgré une forte augmentation au cours de la cinétique. Pour le H₄folate, la quantité résiduelle est supérieure à 65 °C. Pour les deux dérivés, les quantités résiduelles sont supérieures à celles déterminées à la fin des cinétiques de diffusion, pour les deux températures étudiées.

6.3 Conclusions

Pour les épinards et les haricots verts, le composé majoritaire est le 5-CH₃-H₄folate (70 et 75 % respectivement). La dégradation de ce dérivé au cours des cinétiques de dégradation thermique suit une loi d'ordre 1.

Dans un même temps, les autres dérivés de folates ne suivent pas du tout une cinétique de dégradation d'ordre 1. Leurs concentrations sont stables, voire augmentées au cours de la cinétique.

Ceci explique que l'ordre de la cinétique de dégradation des folates totaux dans les purées n'est pas lié à celle du 5-CH₃-H₄folate.

L'évolution des différents dérivés est très contrastée au cours des cinétiques de dégradation thermique au sein des matrices végétales. Afin de déterminer l'impact de la matrice sur la dégradation des dérivés, nous avons étudié la dégradation de deux d'entre eux. Nous avons étudié la dégradation thermique de l'acide folique, très peu dégradé dans les matrices, et celle du 5-CH₃-H₄folate, composé majoritaire fortement dégradé au cours des cinétiques.

7. Cinétique de dégradation thermique de l'acide folique et du 5-CH₃-H₄folate en solution modèle

Les cinétiques de dégradations thermiques ont été réalisées sur deux composés, l'acide folique et le 5-CH₃-H₄folate à une concentration de 1.10^{-7} mol.l⁻¹ dans le réacteur. Deux conditions d'oxygène ont été étudiées, l'anoxie ou la présence de 40 % d'oxygène dans le milieu et deux conditions de pH, 5 et 7. A pH 7, les cinétiques ont été réalisées à deux températures (25°C et 85 °C) pour les deux conditions d'oxygène. A pH 5, les cinétiques ont été étudiées à 25, 65 et 85 °C pour les expériences en présence de 40 % d'oxygène et à 25, 45, 65 et 85 °C pour les cinétiques en anoxie.

7.1 Cinétique en absence d'oxygène

7.1.1 Acide folique

A pH 5 et à 25 °C, il n'y a pas de dégradation de l'acide folique pendant 3 h (Tableau 46). On observe même dans le cas du lot B, une augmentation du rapport C/C_0 donc de la concentration de l'acide folique (Tableau 46).

A pH 5, à 45 °C et à 65 °C, il n'y a pas de dégradation de l'acide folique au cours de la cinétique de 3h (Tableau 46).

Tableau 46 : Evolution de l'acide folique à pH 5 et 7, en anoxie

	pH 5						pH 7			
	25 °C		45 °C	65 °C	85 °C		25 °C		85 °C	
	A	B	A	A	A	B	A	A	B	C
t ₀	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
t ₁₈₀	1,05	1,12	1,11	1,07	0,92	1,15	0,97	0,90	1,10	1,14
% O ₂ initial	0,6	0,1	0,5	0,6	0	0	0,7	0,6	0,05	0,1
% O ₂ final	0	0	0,4	0,5	0	0	6	0,9	0	0

A pH 7 et à 25 °C, l'acide folique est très peu dégradé, seulement 3 % de la concentration initiale sont perdus après 3h (Tableau 46). Le comportement de l'acide folique à 85 °C est plus contrasté, on observe qu'il n'y a pas de dégradation, voire une augmentation d'environ 10 % à 15 % de la concentration initiale pour deux des cinétiques étudiées, alors que pour une des cinétique, une perte de 10 % de la concentration initiale en 3 h est mesurée (Tableau 46). Les augmentations de la concentration de l'acide folique au cours de l'expérience peuvent probablement s'expliquer par une dissolution initiale incomplète du composé, se dissolvant au cours du temps de l'expérience entrainant donc une augmentation de la concentration. Dans ce cas, le C₀ est sous estimé.

7.1.2 5-CH₃-H₄folate

A pH 5, il n'y a pas de dégradation du 5-CH₃-H₄folate à 25, 45 et 85 °C, on observe même une légère augmentation de la concentration à ces températures (Tableau 47). En revanche, à 65 °C la concentration baisse légèrement (de 7 % en 3 h) (Tableau 47). Cependant, le 5-CH₃-H₄folate est globalement stable à pH 5 et en anoxie.

Tableau 47 : Evolution du C/C₀ du 5-CH₃-H₄folate à pH 5 et 7, en anoxie

	pH 5				pH 7					
	25 °C	45 °C	65 °C	85 °C	25 °C			85 °C		
					A	B	C	A	B	C
t ₀	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
t ₅	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	-
t ₁₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38
t ₁₂₀	-	-	-	-	-	-	0,98	-	-	-
t ₁₆₀	1,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t ₁₈₀	-	1,06	0,93	1,02	1,21	0,32	-	1,14	-	-
% O ₂ initial	0,77	0,55	0,52	0,64	0,66	0,23	0	0,67	0,01	0,11
% O ₂ final	0,74	0,53	0,49	0,60	0,57	0	0	0,55	0	0

- : non donné

A pH 7 et à 25 °C, le 5-CH₃-H₄folate a un comportement différent pour les trois essais. Pour une cinétique (A), la concentration augmente au cours de l'expérience, au contraire des essais B et C où une diminution des concentrations est observée, très marquée pour l'essai B et plus modérée pour le troisième (C) (Tableau 47).

La dégradation du 5-CH₃-H₄folate à 85 °C et pH 7 présente des résultats différents entre l'essai A (pas de dégradation) et les deux autres essais étudiés (dégradation très marquée) (Tableau 47).

Le 5-CH₃-H₄folate est plus sensible à la dégradation que l'acide folique.

7.2 En présence de 40 % d'oxygène

7.2.1 Acide folique

A pH 5, il n'y a pas de dégradation thermique de l'acide folique à 25 °C en 3 h pour les essais A et B et en 2 h pour l'essai C (Tableau 48). A 85 °C, l'acide folique dans les mêmes conditions d'oxygène et de pH n'est pas dégradé après 3 h. L'acide folique n'est pas dégradé à pH 5, qu'il y ait ou non de l'oxygène.

Tableau 48 : Evolution de l'acide folique (C/C₀) à pH 5 et 7 en présence de 40 % d'oxygène

	pH 5				pH 7		
	25 °C		85 °C		25 °C	85 °C	
	A	B	A	B	A	A	B
t ₀	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
t ₁₂₀	-	1,01	-	-	-	-	-
t ₁₈₀	1,00	-	1,02	1,04	0,96	0,82	0,89
% O ₂ initial	37,2	37,8	-	37,6	-	-	37,69
% O ₂ final	> 50	37,3	-	38,0	-	-	> 50

- : non donné

A pH 7, en présence d'un flux de 40 % d'oxygène et à 25 °C (Tableau 48), 4 % de l'acide folique initial sont dégradés en 3 h. A 85 °C, le pourcentage de dégradation de l'acide folique après 3 h est supérieur de celui à 25 °C, de l'ordre de 10 à 20 %. A pH 7, même en présence d'un flux d'oxygène à 40 %, et même à 85 °C, la dégradation de l'acide folique est limitée.

7.2.2 5-CH₃-H₄folate

A pH 5 et à 25°C, le taux de dégradation du 5-CH₃-H₄folate est de 10 à 15 % en 120 et 170 min respectivement (Tableau 49). A 65°C et pH 5, le taux de dégradation est de 50 % en 3 h. A 85 °C, la dégradation du 5-CH₃-H₄folate est la plus élevée, elle est de 70 à 85 % en 3 h.

Tableau 49 : Dégradation du 5-CH₃-H₄folate à pH 5 en présence de 40 % d'oxygène

	25°C		65°C		85°C	
	A	B	A	B	A	B
t ₀	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
t ₁₂₀	-	0,90	-	-	-	-
t ₁₇₀	0,85	-	-	-	-	-
t ₁₈₀	-	-	0,52	0,51	0,29	0,15
% O ₂ initial	-	41,07	44,68	40,38	-	43,26
% O ₂ final	-	42,66	41,34	37,32	-	31,45

- : non donné

En présence d'un flux d'oxygène à 40 %, le 5-CH₃-H₄folate est dégradé à pH 5, et ce d'autant plus que la température est élevée.

A pH 7 et à 25 °C, le taux de dégradation du 5-CH₃-H₄folate est de 20 % en 3 h (Tableau 50). A 85 °C, le taux de dégradation est plus élevé qu'à pH 5 : de 90 % en 5 min à 95 % en 40 min.

Tableau 50 : Dégradation du 5-CH₃-H₄folate à pH 7 en présence de 40 % d'oxygène

	25°C		85°C	
	A	A	B	C
t ₀	1,00	1,00	1,00	1,00
t ₅	-	-	0,11	-
t ₂₀	-	-	-	0,04
t ₄₀	-	0,05	-	-
t ₁₈₀	0,81	-	-	-
% O ₂ initial	-	-	> 50	38,81
% O ₂ final	-	-	40,71	36,37

- : non donné

La température influence donc la dégradation du 5-CH₃-H₄folate à pH 7 en présence de 40 % d'oxygène.

Les chromatogrammes obtenus pour le suivi de la cinétique de dégradation du 5-CH₃-H₄folate (Figure 72) montrent l'apparition d'un produit de dégradation du 5-CH₃-H₄folate à 9,5 min, le temps de rétention étant très légèrement inférieur à celui du 5-CH₃-H₄folate. Le pic du 5-CH₃-H₄folate diminue de façon très marquée entre 0 et 2,5 min de cinétique mais l'apparition du produit de dégradation n'arrive qu'après 10 min de cinétique. C'est pourquoi, il semblerait que la dégradation du 5-CH₃-H₄folate fasse intervenir un produit de dégradation intermédiaire à celui observé en fluorescence au temps de rétention de 9,5 min.

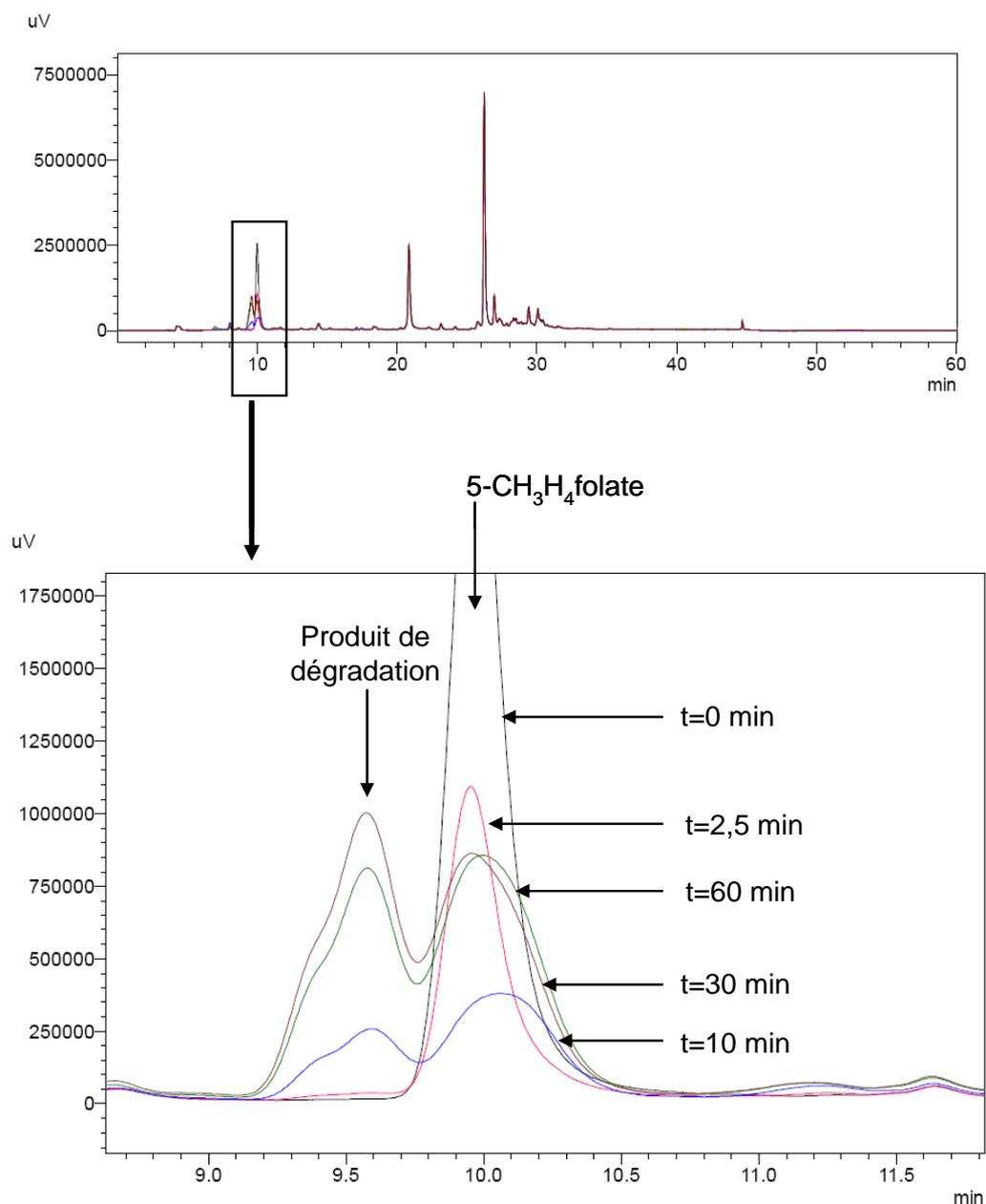


Figure 72 : Chromatogrammes du 5-CH₃-H₄folate de cinq points de cinétique

7.3 Conclusions

Il n'y a aucune dégradation de l'acide folique en 3h lorsque le milieu est privé d'oxygène. En présence de 40 % d'oxygène dans le milieu, l'acide folique n'est pas dégradé à pH 5 et ne l'est que faiblement à pH 7 (en 3 h : 4 % à 25 °C et 15 % à 85 °C).

Les résultats des cinétiques de dégradation thermique sont plus contrastés pour le 5-CH₃-H₄folate. A pH 5 en anoxie, le 5-CH₃-H₄folate est stable hormis à 65 °C où on observe une légère dégradation, de l'ordre de 7 %. En présence de 40 % d'oxygène dans le milieu, la dégradation du 5-CH₃-H₄folate augmente en fonction de la température. Les taux de dégradation varient de 15 % en 2 h à 25 °C à 85 % en 3 h à 85 °C. A pH 7 et à 25 °C en anoxie, les résultats de la dégradation du 5-CH₃-H₄folate sont très différents entre les lots, 70 % en 3 h et 2 % en 2 h. Un facteur non contrôlé dans le réacteur (traces de métaux, contaminant...) semble donc influencer de façon majeure ces cinétiques. Il en est de même à 85 °C, 90 % en 5 min et 60 % en 15 min. Enfin, en présence de 40 % d'oxygène à pH 7, les résultats montrent une augmentation de la dégradation en fonction de la température, de 20 % en 3 h à 25 °C à en moyenne 95 % en 20 min à 85 °C.

En solution modèle, l'acide folique montre une évolution relativement proche de celle observée dans les matrices végétales, même s'il apparaît qu'il soit plus sensible en solution modèle. La matrice semble donc jouer un rôle de protection vis-à-vis de la dégradation de l'acide folique au cours des cinétiques de dégradation thermique.

Le 5-CH₃-H₄folate montre une dégradation comme celle observée dans les matrices. Cependant, la dégradation semble plus importante en solution modèle que dans les matrices végétales. La matrice semble donc avoir également un rôle dans la protection du 5-CH₃-H₄folate. En revanche on observe un plateau au cours des cinétiques de dégradation thermique du composé en solution modèle. Une explication possible est que les produits intermédiaires de dégradation du 5-CH₃-H₄folate soient mesurés en HPLC avec détection en fluorimétrie comme étant du 5-CH₃-H₄folate, entraînant une concentration plus élevée. Le plateau serait lié à ces produits de dégradation, convertis en 5-CH₃-H₄folate lors de la dérivation avant fluorimétrie. Cette hypothèse est vérifiée par l'analyse des chromatogrammes sans réduction qui montrent l'apparition d'un produit de dégradation avec un intermédiaire formé.

8. Discussion

L'étude de la dégradation des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts a été menée afin de prendre en compte la part de la dégradation chimique dans les cinétiques de diffusion. A ce jour, aucune étude sur la cinétique de dégradation thermique des folates dans des matrices végétales n'a encore été menée. Seule des études sur la dégradation thermique des dérivés de folates en solution modèle ont été réalisées.

8.1 Dégradation des folates en solutions modèles

L'étude de la dégradation a été menée sur le 5-CH₃-H₄folate et l'acide folique (PteGlu). Le choix de ces dérivés s'est fait par leur teneur relative dans les deux matrices végétales étudiées et leur comportement au cours des cinétiques de dégradation thermique dans les purées d'épinards et de haricots verts.

Les résultats que nous avons obtenus montrent d'une part que l'acide folique est plus stable pour l'ensemble des conditions (température, pH et teneur en oxygène) que le 5-CH₃-H₄folate. Ces résultats sont en accords avec ceux de O'Broin *et al.* (1975) et de Paine-Wilson *et al.* (1979). De plus, nos résultats montrent une meilleure stabilité des deux composés à pH 5, et lorsque le milieu est privé d'oxygène, en accord avec la littérature (O'Broin *et al.*, 1975 ; Paine-Wilson *et al.*, 1979 ; Barrett *et al.*, 1989 ; Viberg *et al.*, 1997).

En revanche, lorsque nous modélisons les cinétiques de dégradation thermique du 5-CH₃-H₄folate obtenues à l'aide du réacteur instrumenté, nous observons que ces dernières ne suivent pas une loi d'ordre 1, classiquement décrite dans la littérature. Ceci pourrait cependant être un artéfact lié à un des composants (sondes...) du réacteur.

La concentration en 5-CH₃-H₄folate dans ces échantillons a été déterminée par HPLC avec une détection en fluorimétrie. L'analyse des chromatogrammes montre l'apparition d'un produit de dégradation, celui-ci apparaissant après une dizaine de minutes laissant supposer de la présence d'un produit de dégradation intermédiaire.

8.2 Dégradation thermique des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts

Les cinétiques de dégradation des folates dans les purées d'épinards et de haricots verts ont été menées avec trois conditions de teneur en oxygène, oxygène atmosphérique (21%), absence d'oxygène et oxygène à 40%, ceci pour trois températures (45, 65 et 85 °C).

A 21 % d'oxygène dans le milieu réactionnel, globalement pour chaque température, la cinétique de dégradation des folates est comparable dans les épinards et les haricots verts. Pour toutes les températures, un plateau apparaît au cours de la cinétique à la fois pour les épinards et les haricots verts. Les cinétiques ne sont ni d'ordre 1 ni d'ordre 2 pour les trois températures et les deux matrices végétales. Deux possibilités peuvent expliquer ce phénomène, la part prépondérante de l'oxydation dans la dégradation thermique et l'évolution individuelle de chaque dérivé et de leurs produits de dégradation au cours de la cinétique.

De plus, les concentrations en folates dans les échantillons issus des cinétiques de dégradation thermique à 21 % d'oxygène ont été déterminées par HPLC avec une détection en fluorimétrie. La méthode de dosage utilisée à pour principe la dérivatisation de l'ensemble des dérivés en 5-CH₃-H₄folate. Or le produit de dégradation du 5-CH₃-H₄folate, observé en solution modèle, n'est pas visible après dérivatisation. Il est donc possible que des produits de dégradation, formés au cours des cinétiques, soient convertis en 5-CH₃-H₄folate au cours de la dérivatisation. Ceci conduirait à une surestimation des concentrations en folates résiduels.

Les différents vitamères de folates ont été mesurés lors des cinétiques de dégradation des folates en présence de 40 % d'oxygène. Globalement, même si le début des cinétiques, pour les épinards et les haricots verts, est différent, la fin de la cinétique (au niveau du plateau) est du même ordre pour les cinétiques à 21 % et à 40 % d'oxygène, aux trois températures. Pour les deux matrices, le dérivé majoritaire est le 5-CH₃-H₄folate, représentant aux alentours de 70 % des folates totaux. L'évolution de ce dérivé suit une loi d'ordre 1. Les constantes mesurées sont du même ordre que celles trouvées dans la littérature : $110.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 100 °C (Paine-Wilson *et al.*, 1979) ; $72.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 100 °C (Mnkenni *et al.*, 1983) ; $47.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 60 °C pour l'énantiomère (6S) (Oey *et al.*, 2006). En revanche, l'évolution des autres dérivés, notamment le 5-HCO-H₄folate et le 10-HCO-PteGLu, représentant 15 et 10 % des folates totaux respectivement pour les épinards et 14 et 8 % respectivement pour les haricots verts, est différente. Les deux composés sont stables au cours de la cinétique avec une légère diminution de la concentration finale pour le 5-HCO-H₄folate et une augmentation de celle du

10-HCO-PteGlu. Ce comportement explique le plateau observé pour les folates totaux. Les quatre derniers dérivés sont présents en faible voire très faible quantité et leur évolution est contrastée au cours de la cinétique.

Ainsi, la diminution des folates totaux en début de cinétique est due à celle du 5-CH₃-H₄folate et le plateau est dû à la stabilité des autres dérivés.

L'absence de dégradation en absence d'oxygène confirme le rôle de ce dernier. Cependant, il pourrait être plus catalyseur que réactif, étant donné la faible différence entre 21 % et 40 % d'oxygène.

8.3 Impact de la dégradation thermique sur les cinétiques de diffusion

Les cinétiques de dégradation menées dans les mêmes conditions d'oxygène que les cinétiques de diffusion montrent des quantités résiduelles en folate légèrement supérieures à la fin de la cinétique de dégradation pour les épinards (dégradation thermique : environ 40 % ; diffusion : environ 35 %). Par contre, dans les haricots verts, les teneurs résiduelles mesurées à la fin des cinétiques de diffusion sont plus élevées que celles mesurées à la fin des cinétiques de dégradation (diffusion : 59 % à 45 °C et 43 % à 65 °C ; dégradation : 20 % aux deux températures). En outre, ces teneurs résiduelles sont obtenues avec des compositions très différentes, les composés stables lors des dégradations (5-HCO-H₄folate et 10-HCO-PteGlu) étant aussi perdus lors des diffusions. Il semble donc que les parts relatives des pertes par diffusion et par dégradation soient variables selon les vitamines considérées. De plus, les cinétiques de dégradation ont été effectuées sur des purées, et le broyage lui-même pourrait jouer un rôle, soit en facilitant l'accès de l'oxygène aux molécules, soit en modifiant d'une autre manière l'environnement local.

8.4 Impact de la dégradation thermique dans le procédé industriel

Les dégradations observées dans les procédés industriels apparaissent faibles par rapport aux systèmes modèles. Au cours de la stérilisation des haricots verts, la boîte de conserve se comporte comme un système fermé où la présence d'oxygène est relativement limitée. Ce système peut donc être comparé aux résultats que nous avons obtenus au cours des cinétiques de dégradation en absence d'oxygène. Au cours de cette étape du procédé, nous avons

observé une légère dégradation des folates d'environ 10 %. De plus, la durée de traitement est de 6 à 15 min, donc relativement courte.

Au cours du blanchiment, le système se comporte comme les cinétiques de dégradation thermique que nous avons réalisées en présence de 21 % d'oxygène. Au cours de cette étape, nous n'avons pas observé de perte en folates à la fois pour les épinards et pour les haricots verts. Les temps de blanchiment appliqués sont relativement courts comparés à ceux appliqués pour les cinétiques de dégradation thermique (blanchiment des épinards : 70 s à 120 s ; blanchiment des haricots verts : 4 à 8 minutes). De plus, les températures élevées utilisées, correspondent à de très faibles teneurs en oxygène (Winkler, 1888). Enfin, les matrices à leur entrée dans le blanchiment ne sont pas déstructurées. Les résultats que nous avons observés au cours du blanchiment sont relativement concordants avec les conclusions issues des cinétiques de dégradation thermique.

Conclusions et perspectives

1. Conclusion générale

L'augmentation de la teneur en folate dans les légumes transformés serait d'un grand intérêt à la fois pour le consommateur dans un but de bénéfice nutritionnel, et pour les industries alimentaires comme un attribut important de la qualité de leurs produits. Dans ce but, il est primordial de maîtriser le procédé mais surtout son impact sur les folates dans un but de l'adapter pour garantir des teneurs maximales en folates, dans le produit fini. Mon travail de thèse a donc été d'étudier l'impact des procédés de transformation sur les folates dans les légumes verts, afin d'identifier au cours de la transformation les étapes qui impactent sur les pertes en folates. A chaque étape du procédé, plusieurs paramètres physico-chimiques (oxygène, température...) peuvent intervenir dans les pertes en folates.

Le bilan précis des pertes en folate au cours de deux procédés de transformation, la surgélation des épinards et l'appertisation des haricots verts, a montré une perte de 38 % au cours du procédé de surgélation des épinards et de 30 % lors de l'appertisation des haricots verts. Ces pertes occurred préférentiellement aux étapes impliquant un contact étroit entre l'eau et les légumes, plus qu'au cours des traitements thermiques. En effet, lors du procédé de transformation des épinards, nos résultats montrent des pertes au cours de l'étape de lavage (lorsque les concentrations sont exprimées en matière fraîche) et après la stérilisation pour les haricots verts avec une concentration en folates dans les liquides de recouvrement de l'ordre de 20 %. Le blanchiment quant à lui ne cause pas de perte significative en folates que ce soit dans le procédé de surgélation des épinards ou dans le procédé d'appertisation des haricots verts. L'étude des cuissons domestiques va dans le même sens : les traitements seulement thermiques, comme la cuisson à la vapeur, n'induisent pas de perte en folates, au contraire des cuissons mettant en contact les légumes avec l'eau où les pertes varient entre 20 % pour les haricots verts et 50 % pour les épinards. Dans un même temps, l'analyse des liquides de cuisson montre que la plupart des folates sont retrouvés dans ces liquides.

Au cours des procédés de transformations industriels et domestiques, les pertes en folates sont plus marquées lorsque les légumes sont en contact avec l'eau qu'au cours des étapes faisant intervenir des traitements thermiques.

Deux mécanismes sont donc impliqués dans la perte en folates au cours des procédés de transformation industriels ou domestiques, la diffusion (ou lessivage) des folates vers les liquides environnants et la dégradation chimique, celle-ci étant supposée, au vue des travaux antérieurs, être une oxydation.

L'étude de la diffusion a été menée à l'aide d'un dispositif original permettant une diffusion des folates à partir de légumes cuits. Notre système a été validé par l'étude de la diffusion des sucres et acides, molécules hydrosolubles stables chimiquement au cours des traitements thermiques. Les constantes de diffusivité calculées pour les sucres et acides sont de $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à partir des épinards et de $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement à partir des haricots verts. Pour les folates, les constantes de diffusivité calculées sont du même ordre que celles des sucres et acides, avec le même différentiel entre les deux matrices. Le pH et la température n'ont pas d'influence sur la cinétique de diffusion, au contraire de la matrice végétale. Les constantes de diffusivité sont plus faibles pour les épinards, mais la géométrie de ce légume entraîne des pertes par diffusion plus rapides qu'à partir des haricots verts.

Cependant, au cours des cinétiques de diffusion, des mécanismes conjoints de dégradation thermique par oxydation ne peuvent être exclus, les folates étant décrits comme sensibles à l'oxydation. Un indice supplémentaire de cette dégradation est le changement des proportions des différents vitamères après diffusion, surtout aux températures les plus élevées. Les cinétiques de dégradation ont été menées dans des épinards et des haricots verts broyés, à l'aide d'un réacteur instrumenté, en présence de différentes teneurs en oxygène (absence d'oxygène, 21 % ou 40 %). Ces cinétiques ne montrent pas de dégradation lorsque le milieu est privé d'oxygène. En revanche, elles sont similaires, pour les épinards et pour les haricots verts, lorsque la teneur en oxygène est de 21 % ou 40 %. Nous avons donc montré l'impact élevé de l'oxygène sur la dégradation des folates dans des purées d'épinards et des purées de haricots verts. La cinétique de dégradation des folates dans les purées de légumes ne suit pas une loi d'ordre 1, alors que de telles lois sont classiquement décrites pour la dégradation des folates. Un plateau apparaît aux températures testées, qui a pu être relié à des sensibilités très variables des différents dérivés représentés dans les deux légumes. Les deux dérivés formylés qui constituent les 2^{ème} et 3^{ème} vitamères les plus abondants dans ces légumes sont en particulier très stables dans nos conditions d'étude.

Au vue de nos résultats, et en particulier des cinétiques relatives de diffusion et de dégradation, les mécanismes de diffusion semblent prépondérants vis-à-vis de l'oxydation aux temps courts rencontrés dans les procédés, particulièrement pour les épinards. Les quantités en folates retrouvées dans les liquides de recouvrement des boîtes de conserve ou dans les liquides de cuissons d'ailleurs, sont significatives. C'est pourquoi il semblerait adéquat d'adapter le procédé de transformation (industriel ou domestique) en limitant les contacts avec l'eau, lors du blanchiment via des blanchiments à la vapeur ou lors de la stérilisation avec des procédés de stérilisation à la vapeur. De plus, à l'échelle du consommateur, il serait favorable de préconiser des cuissons à la vapeur plutôt que par ébullition dans de l'eau. Quoiqu'il en soit, les légumes transformés restent cependant de bonnes sources en folates pour les consommateurs, et les pertes constatées sont plutôt moins élevées que ne le laissaient pressentir les travaux antérieurs.

2. Perspectives

Notre étude a déterminé les concentrations des folates totaux et des différents dérivés au cours de la surgélation des épinards et de l'appertisation des haricots verts. Nous avons observé que le mécanisme majeur impliqué est un mécanisme de diffusion. Cependant, il serait intéressant d'identifier et de suivre l'évolution des produits de dégradation des folates au cours du procédé. Un point important serait d'ailleurs de mettre en évidence une éventuelle interconversion, en particulier vers les dérivés formylés. De plus, il serait intéressant de faire une étude croisée et d'étudier le devenir des folates au cours de la transformation en prenant comme modèle d'étude une chaîne de surgélation de haricots verts et une chaîne d'appertisation d'épinards. Ceci permettrait d'évaluer quel procédé est le plus adapté contre la dégradation des folates.

L'étude de la diffusion des folates présentée dans la thèse montre un effet important de la matrice dans la diffusion des folates. Avant les expériences de diffusion, les légumes ont subi une déstructuration par cuisson. Il serait, par conséquent, intéressant d'évaluer par microscopie l'état de cette déstructuration de la matrice, pour éventuellement la corrélérer avec la diffusion des folates. Les folates sont compartimentés au niveau tissulaire et subcellulaire : dans les haricots verts par exemple, les concentrations en folates sont plus élevées dans les graines que dans le parenchyme. Il serait par conséquent intéressant d'étudier la diffusion des

folates à partir des différentes structures histologiques, comme par exemple à partir des graines et à partir du parenchyme. Enfin, les folates présentant une longueur de la queue polyglutamate différente, il serait intéressant d'étudier l'évolution et l'impact de la longueur de la queue polyglutamate au cours des cinétiques de diffusion.

Les cinétiques de dégradation thermique ont été réalisées à l'aide d'un réacteur instrumenté. Les principaux paramètres physico-chimiques sont contrôlés au cours des cinétiques. Cependant, certains résultats montrent l'existence de paramètres encore mal contrôlés influençant les cinétiques, en particulier en solutions modèles. Ceux-ci sont de deux ordres :

- D'une part un des composants du dispositif (mode d'introduction des folates, présence de sondes avec des surfaces réactives) pourrait causer les variations constatées entre les essais ;
- D'autre part, cette variabilité pourrait provenir de la gestion des échantillons en amont et en aval du réacteur.

C'est pourquoi, la finalisation du suivi direct de la dégradation des folates à l'aide de sondes à fluorescence et à absorbance semble d'un très grand intérêt.

L'ensemble de l'étude a montré que les folates sont globalement assez bien conservés au cours du procédé de transformation. Une des pistes de recherche qui prendrait un sens dans la continuité de ce travail serait l'étude de l'impact des procédés de transformation sur la bioaccessibilité des folates.

Références bibliographiques

A.

Acker, J. P., Elliott, J. A. W., & McGann, L. E. (2001). Intercellular ice propagation: experimental evidence for ece growth through membrane pores. *Biophysical journal*, 81(3), 1389-1397.

Aiso, K., & Tamura, T. (1998). Trienzyme treatment for food folate analysis: optimal pH and incubation time for α -Amylase and protease treatments. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44(3), 361-370.

Aslinia, F., Mazza, J. J., & Yale, S. H. (2006). Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 236-241.

ANSES : Apports nutritionnels conseillés en acide folique pour la population Française : <http://www.anses.fr/Documents/ANC-Ft-TableauVitB9.pdf>

B.

Bailey, L. B., Barton, L. E., Hillier, S. E., & Cerda, J. J. (1988). *Bioavailability of mono and polyglutamyl folate in human subjects*. Los Altos, CA, Etats-Unis: Geron-X

Barrett, D. M., & Lund, D. B. (1989). Effect of oxygen on thermal degradation of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid. *Journal of Food Science*, 54(1), 146-149.

Bazinet, L., & Castaigne, F. (2011). *Concepts de génie alimentaire, Procédés associés et applications à la conservation des aliments* Paris.

Bedhomme, M., Hoffmann, M., McCarthy, E. A., Gambonnet, B., Moran, R. G., Rébeillé, F., & Ravanel, S. (2005). Folate metabolism in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34823-34831.

Bekaert, S., Storozhenko, S., Mehrshahi, P., Bennett, M. J., Lambert, W., Gregory, J. F., Schubert, K., Hugenholtz, J., Van Der Straeten, D., & Hanson, A. D. (2008). Folate biofortification in food plants. *Trends in plant science*, 13(1), 28-35.

Blakley, R. L. (1969). *The biochemistry of folic acid and related pteridines*. Amsterdam, London: North-Holland Publishing Co.

Bomben, J. L., King, C. J., & Hayes, T. L. (1983). Cold-stage scanning electron microscope measurement of ice morphology in apple tissue as a function of freezing rate. *Cryobiology*, 20(5), 574-586.

Boutron-Ruault, M. C., Senesse, P., Faivre, J., Couillault, C., & Belghiti, C. (1996). Folate and alcohol intakes: Related or independent roles in the adenomae carcinoma sequence? *Nutrition and Cancer*, 26(3), 337-346.

Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., & Steegers-Theunissen, R. P. M. (2001). Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutrition Research Reviews*, 14(02), 267-294.

C.

Castenmiller, J. J. M., van de Poll, C. J., West, C. E., Brouwer, I. A., Thomas, C. M. G., & van Dusseldorp, M. (2000). Bioavailability of Folate from Processed Spinach in Humans. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44(4), 163-169.

Cavuoto, P., & Fenech, M. F. (2012). A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 726-736.

Chen, T.S., & Cooper, R.G. (1979). Thermal destructure of folacin: effect of ascorbic acid, oxygen and temperature. *Journal of Food Science*, 44(3), 713-716.

Cooper, R. G., Chen, T. S., & King, M. A. (1978). Thermal destruction of folacin in microwave and conventional baking. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 73, 406.

Cossins, E. A., & Chen, L. (1997). Foliates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry*, 45(3), 437-452.

D.

Dang, J., Arcot, J., & Shrestha, A. (2000). Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry*, 68(3), 295-298.

Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I. J. J., Strain, J. J., Favell, D., & Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 825-860

Day, & J. F, G. (1983). Thermal stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in liquid model food systems. *Journal of Food Science*, 48(2), 581-587.

De Brouwer, V., Zhang, G. F., Storozhenko, S., Van Der Straeten, D., & Lambert, W. E. (2007). pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochemical Analysis*, 18(6), 496-508.

DeSouza, S. C., & Eitenmiller, R. R. (1986). Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli. *Journal of Food Science*, 51(3), 626-628.

F.

Fleming, A., & Copp, A. J. (1998). Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science*, 280(5372), 2107-2109.

Freisleben, A., Schieberle, P., & Rychlik, M. (2003). Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 315(2), 247-255.

Friedman, L., & Kraemer, E. O. (1930). Diffusion of non electrolytes in gelatin gels. *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 1305.

G.

Gliszczynska-Swiglo, A. (2007). Folates as antioxidants. *Food Chemistry*, 101(4), 1480-1483.

Gregory, J. F., Bhandari, S. D., Bailey, L. B., Toth, J. P., Baumgartner, T. G., & Cerda, J. J. (1992). Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl tetrahydrofolates and folic acid in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(6), 1147-1153.

Gutzeit, D., Mönch, S., Jerz, G., Winterhalter, P., & Rychlik, M. (2008). Folate content in sea buckthorn berries and related products (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*): LC-MS/MS determination of folate vitamers stability influenced by processing and storage assessed by stable isotope dilution assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 211-219.

H.

Hawkes, J. G., & Villota, R. (1989). Folates in foods - Reactivity, stability during processing, and nutritional implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(6), 439-538.

Hefni, M., Öhrvik, V., Tabekha, M., & Witthöft, C. (2010). Folate content in foods commonly consumed in Egypt. *Food Chemistry*, 121(2), 540-545.

Heseker, H., & Schmitt, G. (1987). Effect of long-term supplementation of folate on folate status in plasma and erythrocytes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 33(3), 163-168.

Holasova, M., Vlasta, F., & Slavomira, V. (2008). Determination of folates in vegetables and their retention during boiling. *Czech Journal of food science*, 26(1), 31-37.

Honein, M., Paulozzi, L. J., Mathews, T. J., Erickson, J., & C.Wong, L. (2001). Impact of folic acid fortification of the us food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(23), 2981-2986.

I.

Indrawati, van Loey, A., & Hendrickx, M. (2005). Pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry: 53* (8) 3081-3087, 53(8), 3081-3087.

Indrawati, Verlinde, P., Ottoy, F., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2004). Implications of β -mercaptoethanol in relation to folate stability and to determination of folate degradation

kinetics during processing: A case study on [6S]-5-methyltetrahydrofolic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8247-8254.

Iwatani, Y., Arcot, J., & Shrestha, A. K. (2003). Determination of folate contents in some Australian vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(1), 37-48.

J.

Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B. S., Chattopadhyay, S., & Mukherjee, T. (2001). Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(12), 1390-1399.

Julliard, J. H. (1994). Purification and Characterization of Oxopantoyl Lactone Reductase from Higher Plants : Role in Panthteante Synthesis. *Botanica acta*, 107, 191-200.

K.

Kang, Y. J. (2011). Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 129(3), 321-331.

Klein, B. P., Lee, H. C., Reynolds, P. A., & Wangles, N. C. (1979). Folacin content of microwave and conventionally cooked frozen vegetables. *Journal of Food Science*, 44(1), 286-288.

Konings, E. J., Roomans, H. H., Dorant, E., Goldbohm, R. A., Saris, W. H., & van den Brandt, P. A. (2001). Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(4), 765-776.

L.

Lafay, L. (2009). Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA-2). <http://www.anses.fr/Documents/PASER-Ra-INCA2.pdf>. (in french), uploaded January 2012.

Leichter, J., Landymore, A., & Krumdieck, C. (1979). Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content. *Am J Clin Nutr*, 32(1), 92-95.

Lesková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Kosická, M., Porubská, J., & Holcíková, K. (2006). Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 252-276.

Lin, B. F., & Lin, R. F. (1999). Effect of chinese stir-fry cooking on folate contents of vegetables *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 37(4), 443-454.

M.

- Malin, J. D. (1977).** Total folate activity in Brussels sprouts: the effects of storage, processing, cooking and ascorbic acid content. *International Journal of Food Science & Technology*, 12(6), 623-632.
- Malinow, M. R., Duell, P. B., Hess, D. L., Anderson, P. H., Kruger, W. D., Phillipson, B. E., Gluckman, R. A., Block, P. C., & Upton, B. M. (1998).** Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, 338(15), 1009-1015.
- McKillop, D. J., Pentieva, K., Daly, D., McPartlin, J. M., Hughes, J., Strain, J. J., Scott, J. M., & McNulty, H. (2002).** The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *British Journal of Nutrition*, 88(06), 681-688.
- McNulty, H., & Pentieva, K. (2004).** Folate bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(04), 529-536.
- Melse-Boonstra, A., Verhoef, P., Konings, E. J. M., van Dusseldorp, M., Matser, A., Hollman, P. C. H., Meyboom, S., Kok, F. J., & West, C. E. (2002).** Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate folate contents of leeks, cauliflower, and green beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3473-3478.
- Mnkeni, A. P., & Beveridge, T. (1983).** Thermal destruction of 5-methyltetrahydrofolic acid in buffer and model food systems. *Journal of Food Science*, 48(2), 595-599.
- Moat, S. J., Lang, D., McDowell, I. F. W., Clarke, Z. L., Madhavan, A. K., Lewis, M. J., & Goodfellow, J. (2004).** Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(2), 64-79.
- Müller, H. (1993).** Determination of folic acid contents in vegetables and fruits by HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 196, 137-141.

N.

- Nakano, E., Higgins, J. A., & Powers, H. J. (2001).** Folate protects against oxidative modification of human LDL. *British Journal of Nutrition*, 86(06), 637-639.
- Ndaw, S., Bergaentzlé, M., Aoudé-Werner, D., Lahély, S., & Hasselmann, C. (2001).** Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. *Journal of Chromatography A*, 928(1), 77-90.
- Nguyen, M., Oey, I., Hendrickx, M., & van Loey, A. (2006).** Kinetics of (6R,S) 5-formyltetrahydrofolic acid isobaric–isothermal degradation in a model system. *European Food Research and Technology*, 223(3), 325-331.

O.

O'Broin, J. D., Temperley, I. J., Brown, J. P., & Scott, J. M. (1975). Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 28(5), 438-444.

O'Hare, T. J., Pyke, M., Scheelings, P., Eaglesham, G., Wong, L., Houlihan, A., & Graham, G. (2012). Impact of low temperature storage on active and storage forms of folate in choy sum (*Brassica rapa* subsp. *parachinensis*). *Postharvest Biology and Technology*, 74(0), 85-90.

Oey, I., Verlinde, P., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2006). Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or [6s]5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study. *European Food Research and Technology*, 223(1), 71-77.

Ohrvik, V. E., & Witthoft, C. M. (2011). Human folate bioavailability. *Nutrients*, 3(4), 475-490.

P.

Paine-Wilson, B., & Chen, T.-S. (1979). Thermal destrucuration of folacin: effect of pH and buffer ions. *Journal of Food Science*, 44(3), 717-722.

Paul, A. A., & Southgate, D. A. T. (1978). *McCance and Widdowsons' The Composition of Foods*, 4th rev. and extended Ed. Elsevier, Amsterdam.

Prabhu, V., Brock Chatson, K., Lui, H., Abrams, G. D., & King, J. (1998). Effects of sulfanilamide and methotrexate on ¹³C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 116(1), 137-144.

Pitrat, M., & Foury, C. (2003). *Histoire de légumes, des origines à l'orée du XXIe siècle*. Paris: INRA.

Q.

Quinlivan, E. P., Roje, S., Basset, G., Shachar-Hill, Y., Gregory, J. F., & Hanson, A. D. (2003). The folate precursor p-Aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20731-20737.

R.

Raman, S. B., & Rathinasabapathi, B. (2004). Pantothenate synthesis in plants. *Plant Science*, 167(5), 961-968.

- Rebeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J.-M., Garin, J., & Douce, R. (1997).** Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase-7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *EMBO J*, 16(5), 947-957.
- Rébeillé, F., Jabrin, S., Bligny, R., Loizeau, K., Gambonnet, B., Van Wilder, V., Douce, R., & Ravanel, S. (2006).** Methionine catabolism in Arabidopsis cells is initiated by a γ -cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15687-15692.
- Rébeillé, F., Alban, C., Bourguignon, J., Ravanel, S., & Douce, R. (2007).** The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynthesis Research*, 92(2), 149-162.
- Ruddick, J. E., Vanderstoep, J., & Richards, J. F. (1980).** Kinetics of thermal degradation of methyltetrahydrofolic acid. *Journal of Food Science*, 45(4), 1019-1022.
- Rychlik, M. (2004).** Revised folate content of foods determined by stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(3-4), 475-483.
- Rychlik, M., Englert, K., Kapfer, S., & Kirchoff, E. (2007).** Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 411-419.
- Rychlik, M., & Adam, S. (2008).** Glucosinolate and folate content in sprouted broccoli seeds. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1057-1064.

S.

- Schwartzberg, H. G., & Chao, R. Y. (1982).** Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technology*, 36, 74-77.
- Scott, J., Rébeillé, F., & Fletcher, J. (2000).** Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 795-824.
- Selman, J. D. (1994).** Vitamin retention during blanching of vegetables. *Food Chemistry*, 49(2), 137-147.
- Sérino, S., Gomez, L., Costagliola, G., & Gautier, H. (2009).** HPLC Assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8753-8760.
- Shrestha, A. K., Arcot, J., & Paterson, J. (2000).** Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. *Food Chemistry*, 71(4), 545-552.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2000).** *Food composition and nutrition tables*. Deutsche forshungsanstalt für lebensmittelchemie, Garching b. München.
- Sotiriadis, P. K., & Hoskins, F. H. (1982).** Vitamin retention during storage of processed foods. I. Effect of ascorbic acid on folates in cowpeas, okra and tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 16(2), 125-130.

Stea, T. H., Johansson, M., Jägerstad, M., & Frølich, W. (2006). Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. *Food Chemistry*, 101(3), 1095-1107.

Stocker, P., Lesgards, J.-F., Vidal, N., Chalier, F., & Prost, M. (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1621(1), 1-8.

Stover, P. J. (2004). Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutrition Reviews*, 62, S3-S12.

T.

Tamura, T., Shin, Y. S., Buehring, K. U., & Stokstad, E. L. R. (1976). The availability of folates in man: effect of orange juice supplement on intestinal conjugase. *British Journal of Haematology*, 32(1), 123-134.

Tamura, T., & Picciano, M. F. (2006). Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*, 83(5), 993-1016.

Tarr, R., & Pufulete, M. (2005). Folate and colorectal cancer - a review of the current evidence. *Nutrition Bulletin*, 30(4), 356-363.

U.

USDA : USDANutrient Database: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

Unilet : <http://www.unilet.fr/>

V.

Vahteristo, L., Lehtikoinen, K., Ollilainen, V., & Varo, P. (1997). Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chemistry*, 59(4), 589-597.

Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., & Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 880-912.

Van Het Hof, K. H., Tijburg, L. B. M., Pietrzik, K., & Weststrate, J. A. (1999). Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *British Journal of Nutrition*, 82(03), 203-212.

Viberg, U., Jägerstad, M., Öste, R., & Sjöholm, I. (1997). Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. *Food Chemistry*, 59(3), 381-386.

Vukov, K., & Monzpart Senyi, J. (1977). Saftgewinnung aus Zuckerruben und Äpfeln durch Gegenstromextraktion. *Z. Zuckerind*, 27(8).

W.

Winkler. (1888). Die bestimmung im wasser gelösten sauerstoffes. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft* 21, 2843-2854.

X.

Xiaowei, Ng., Lucock, M., & Veysey, M. (2008). Physicochemical effect of pH and antioxidants on mono- and triglutamate forms of 5-methyltetrahydrofolate, and evaluation of vitamin stability in human gastric juice: Implications for folate bioavailability. *Food Chemistry*, 106(1), 200-210.

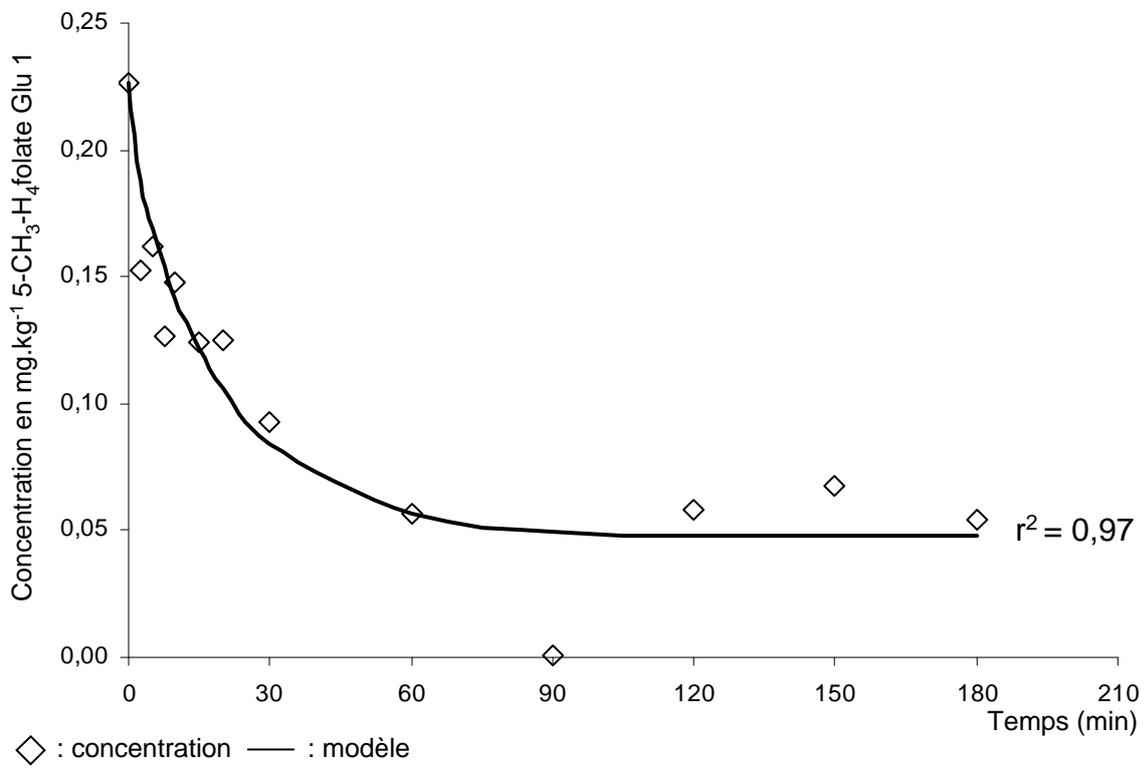
Z.

Zhang, G.-F., Storozhenko, S., Van Der Straeten, D., & Lambert, W. E. (2005). Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1078(1-2), 59-66.

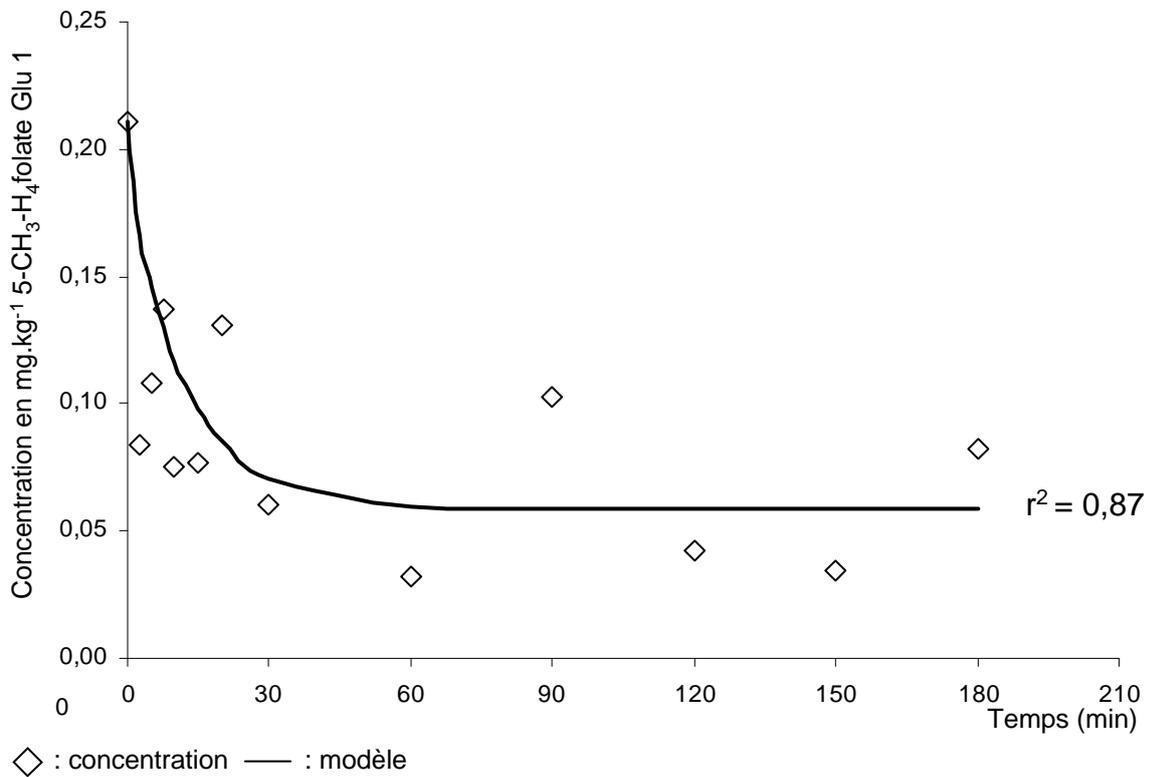
Zhao, R., Matherly, L. H., & Goldman, I. D. (2009). Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, 1-28.

Annexes

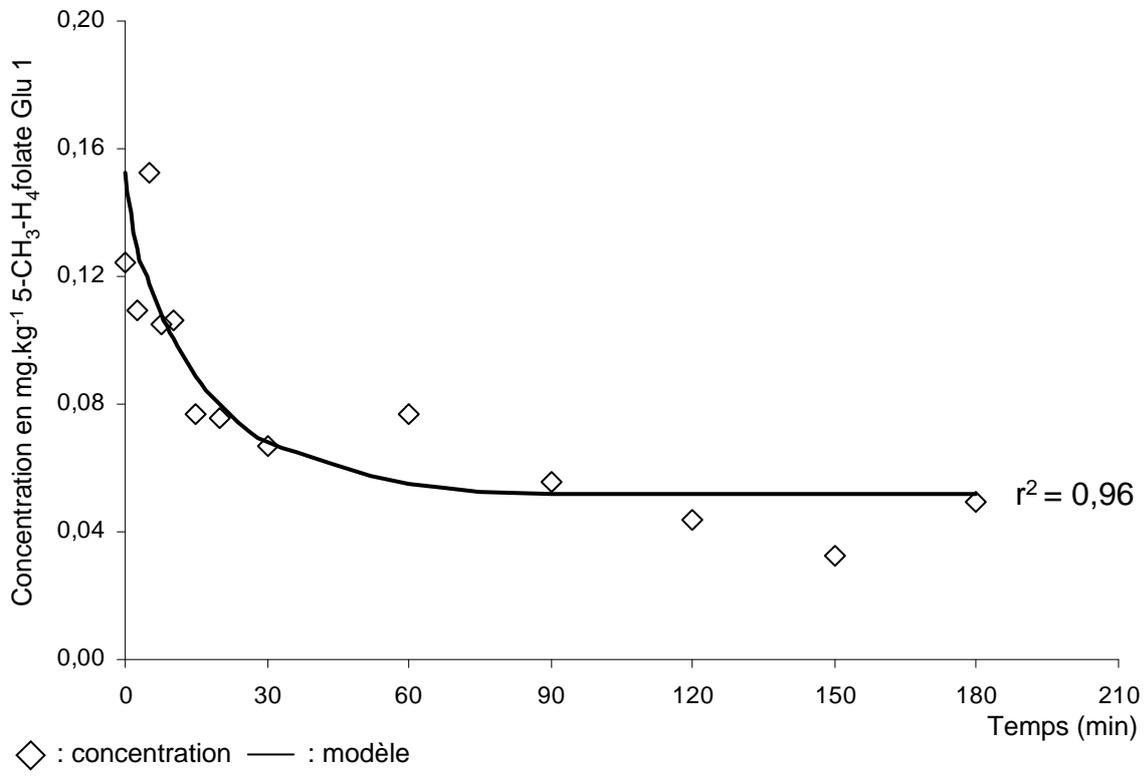
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 25 °C - Lot 1



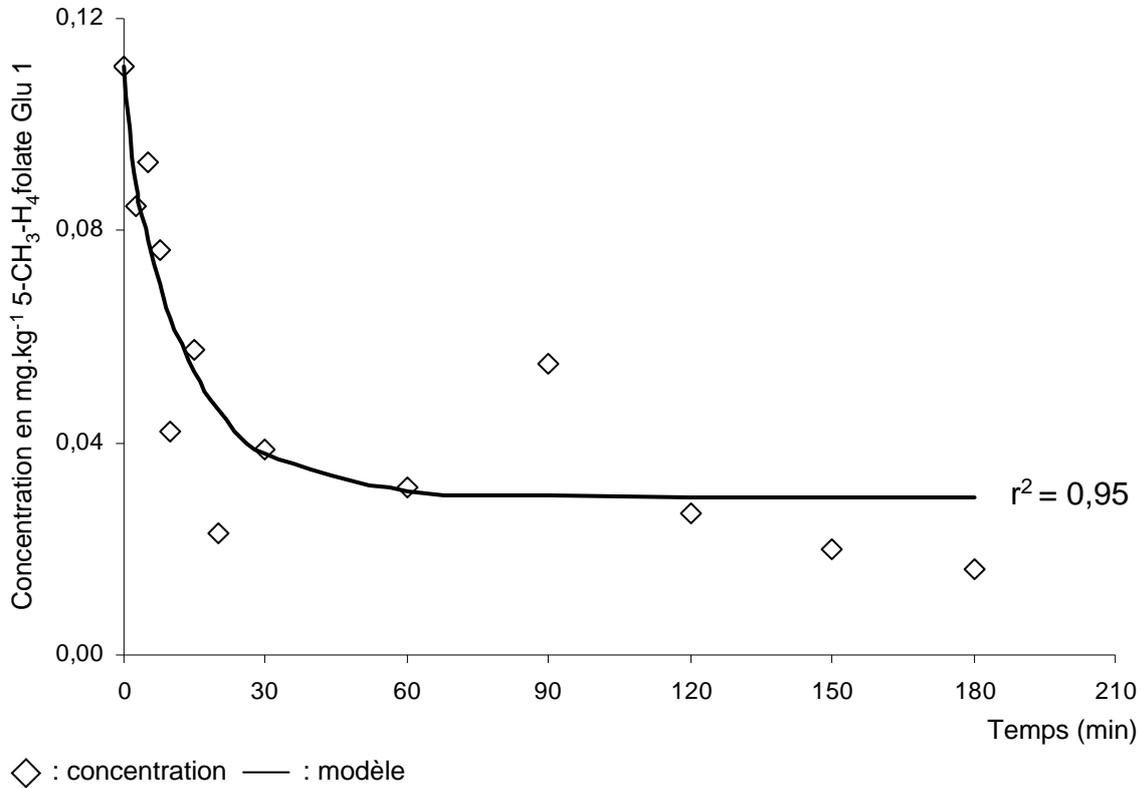
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 25 °C - Lot 2



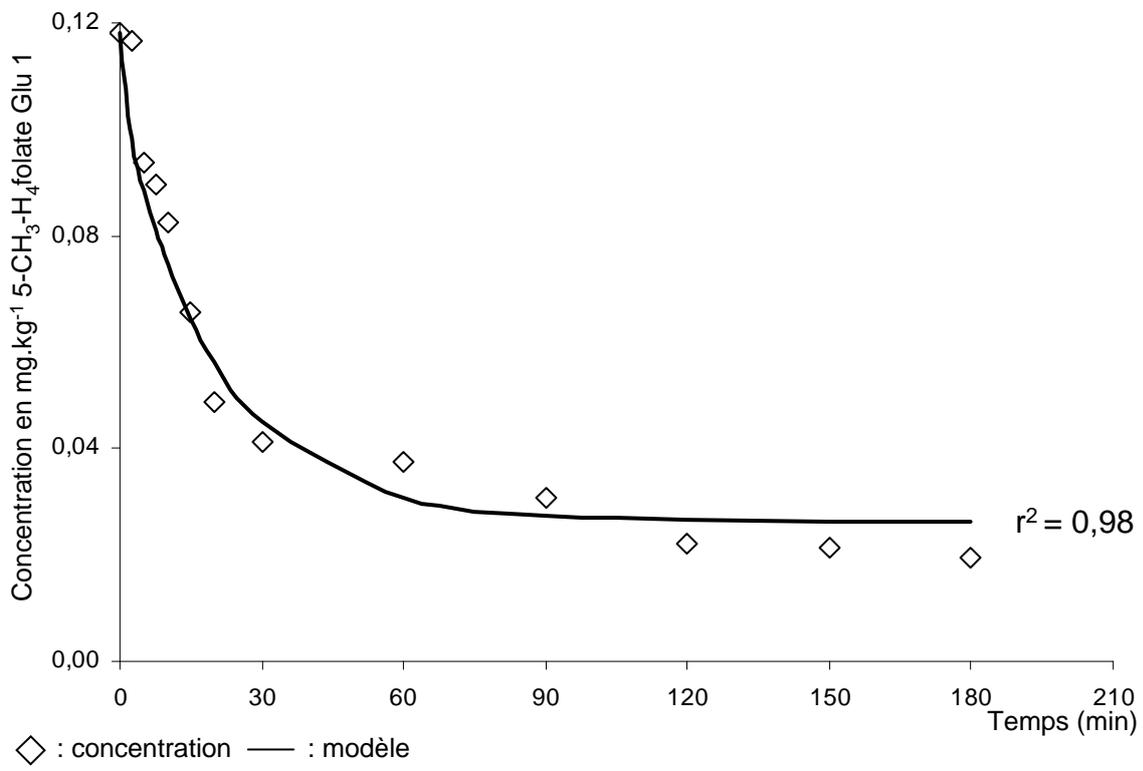
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 25 °C - Lot 3



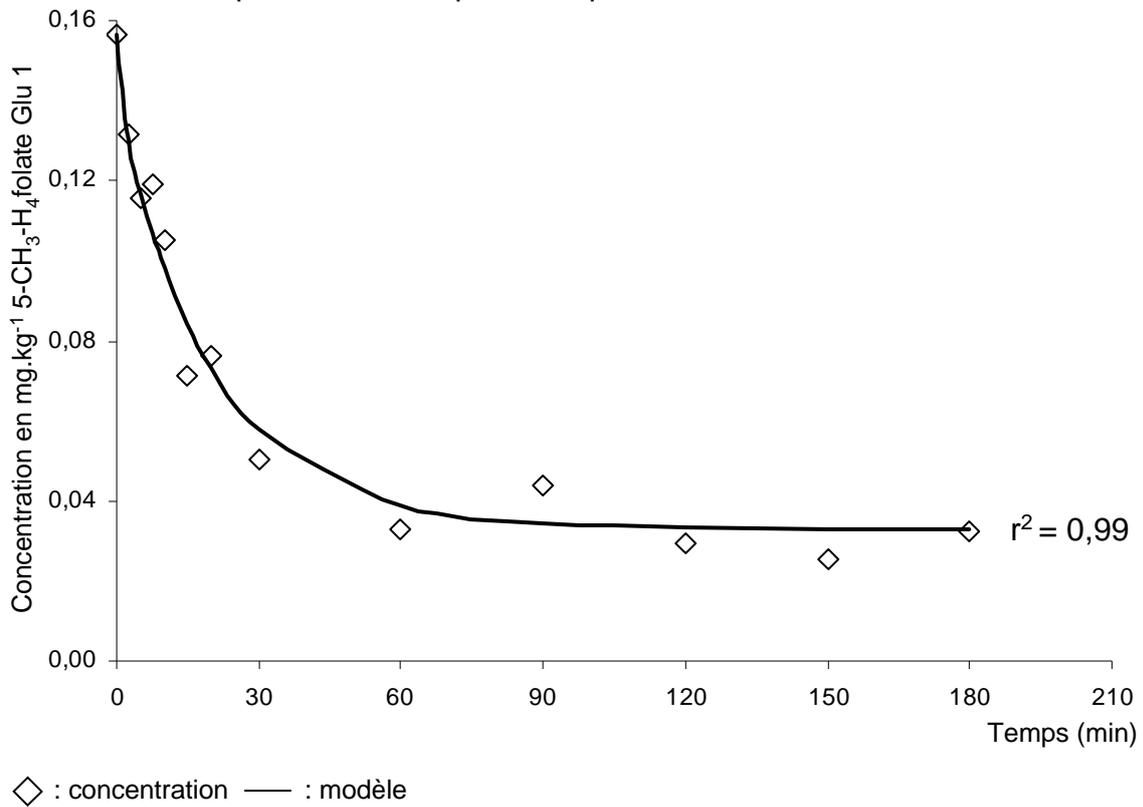
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 45 °C - Lot 1



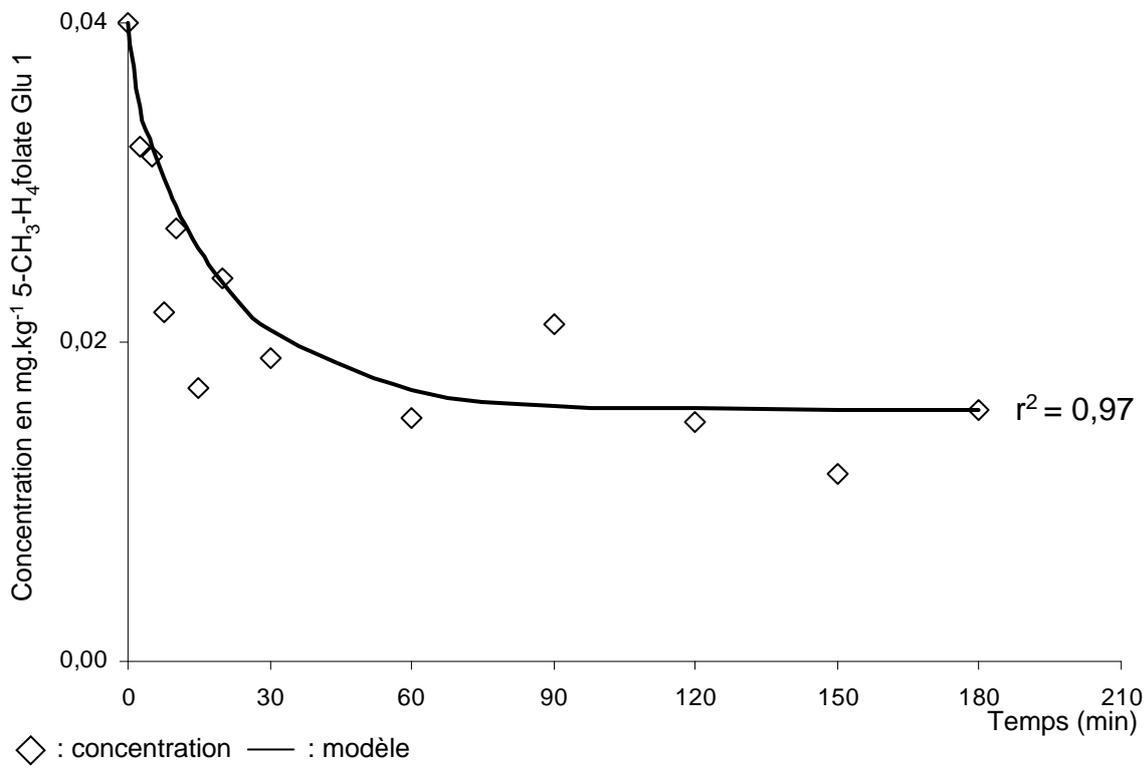
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 45 °C - Lot 2



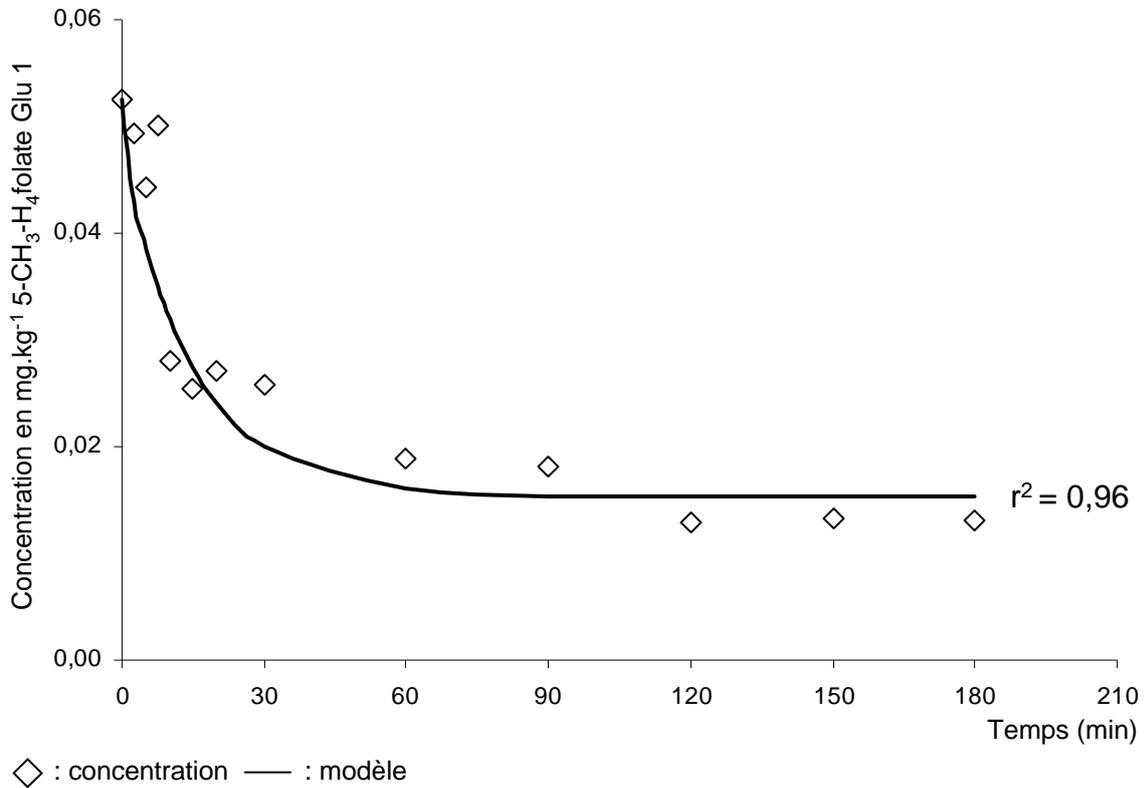
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 45 °C - Lot 3



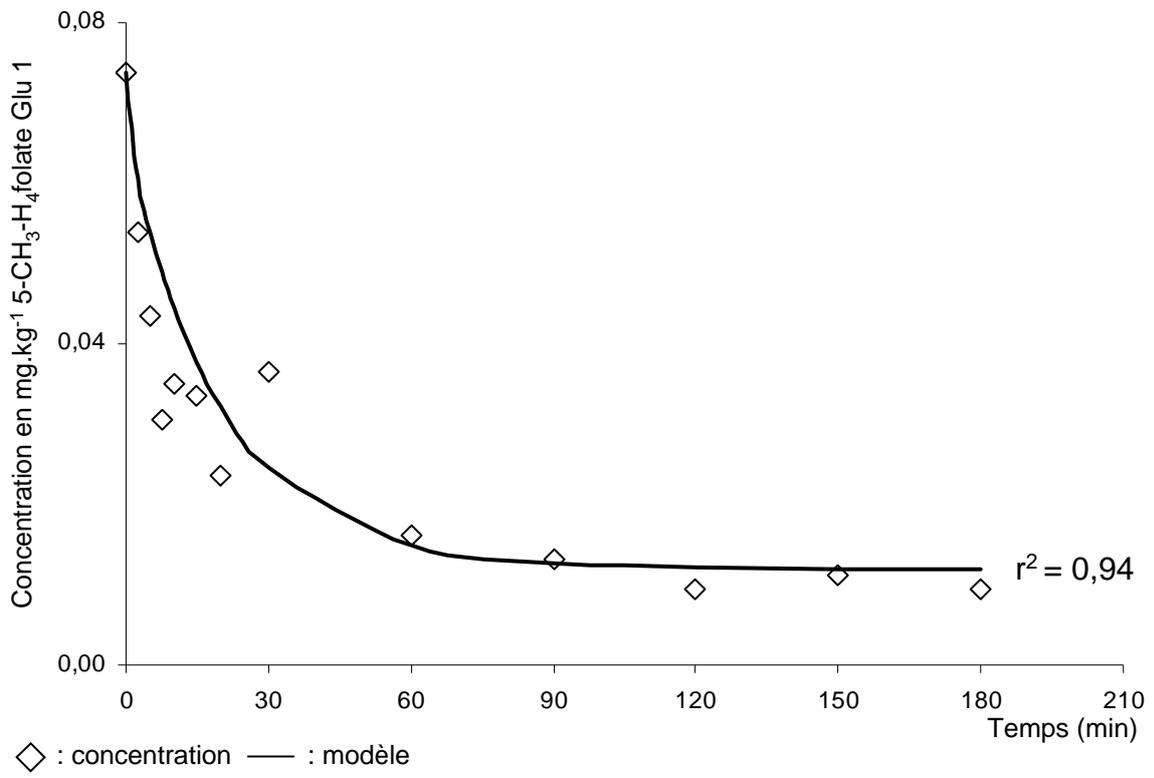
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 65 °C - Lot 1



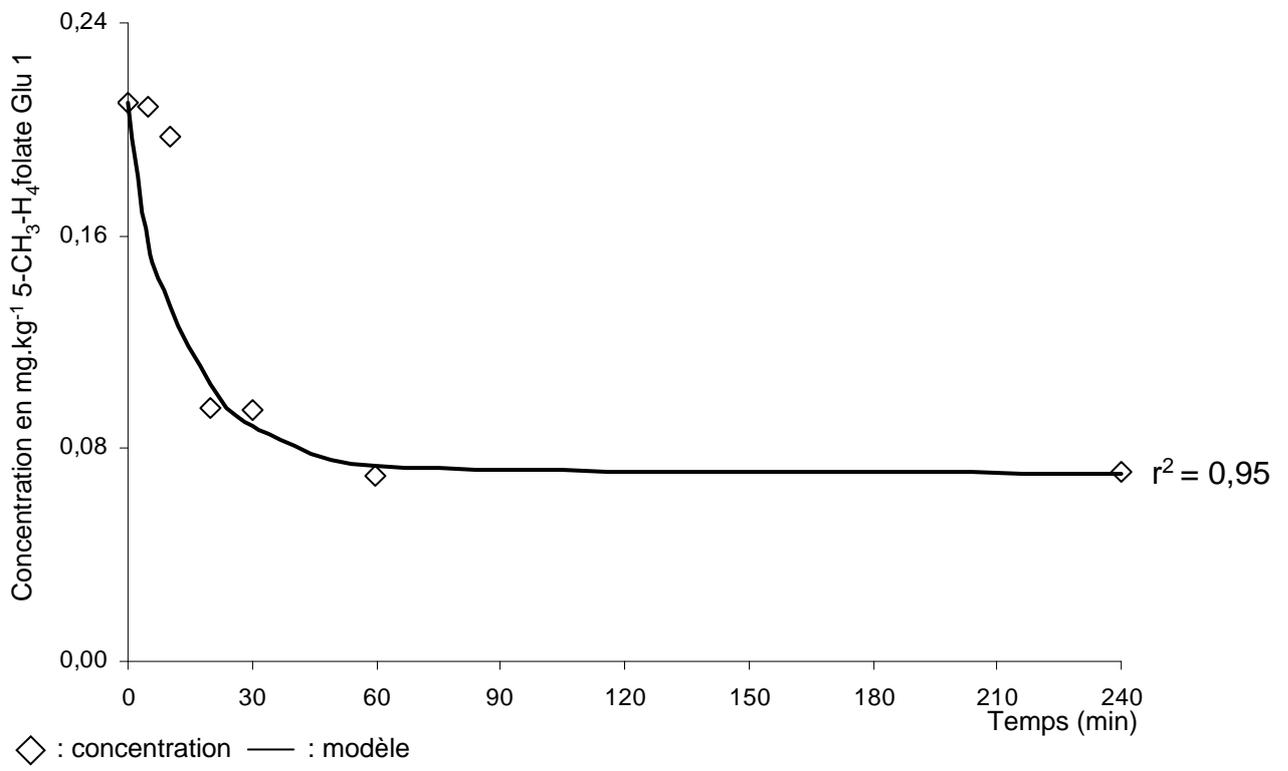
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 65 °C - Lot 2



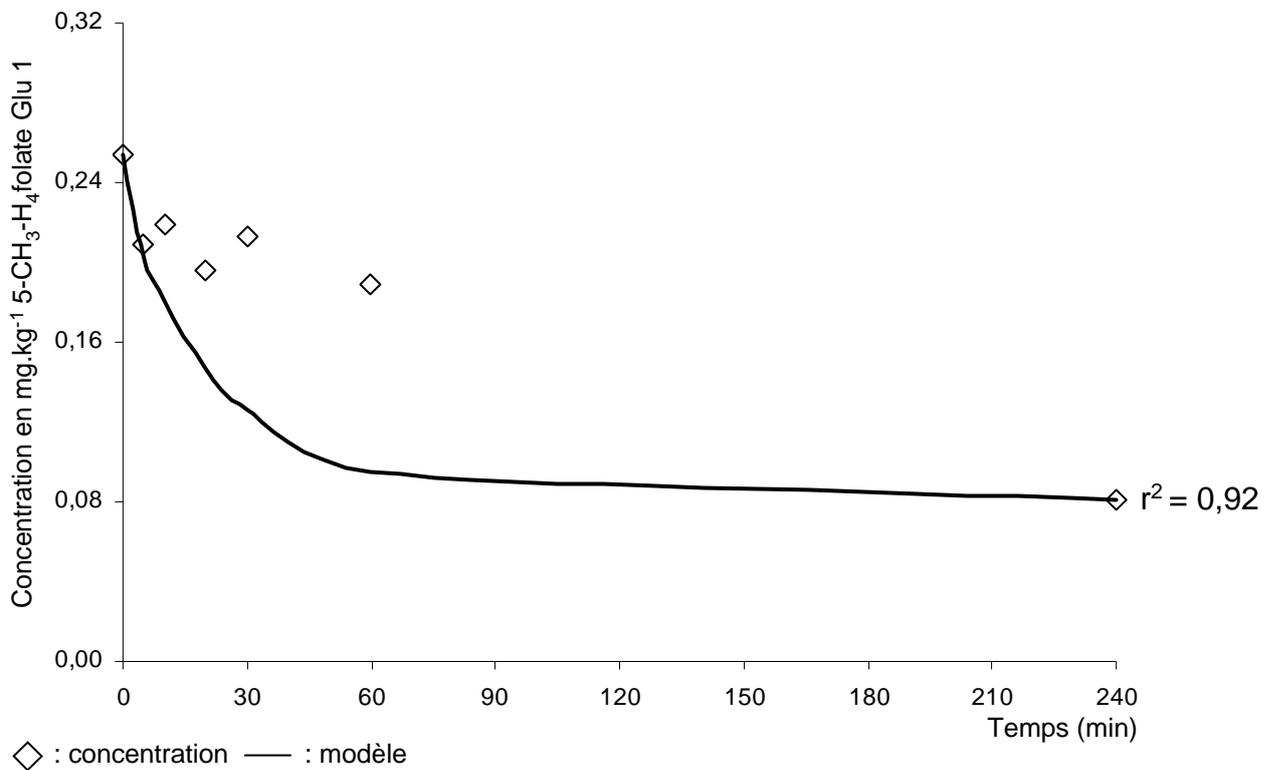
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 7 - 65 °C - Lot 3



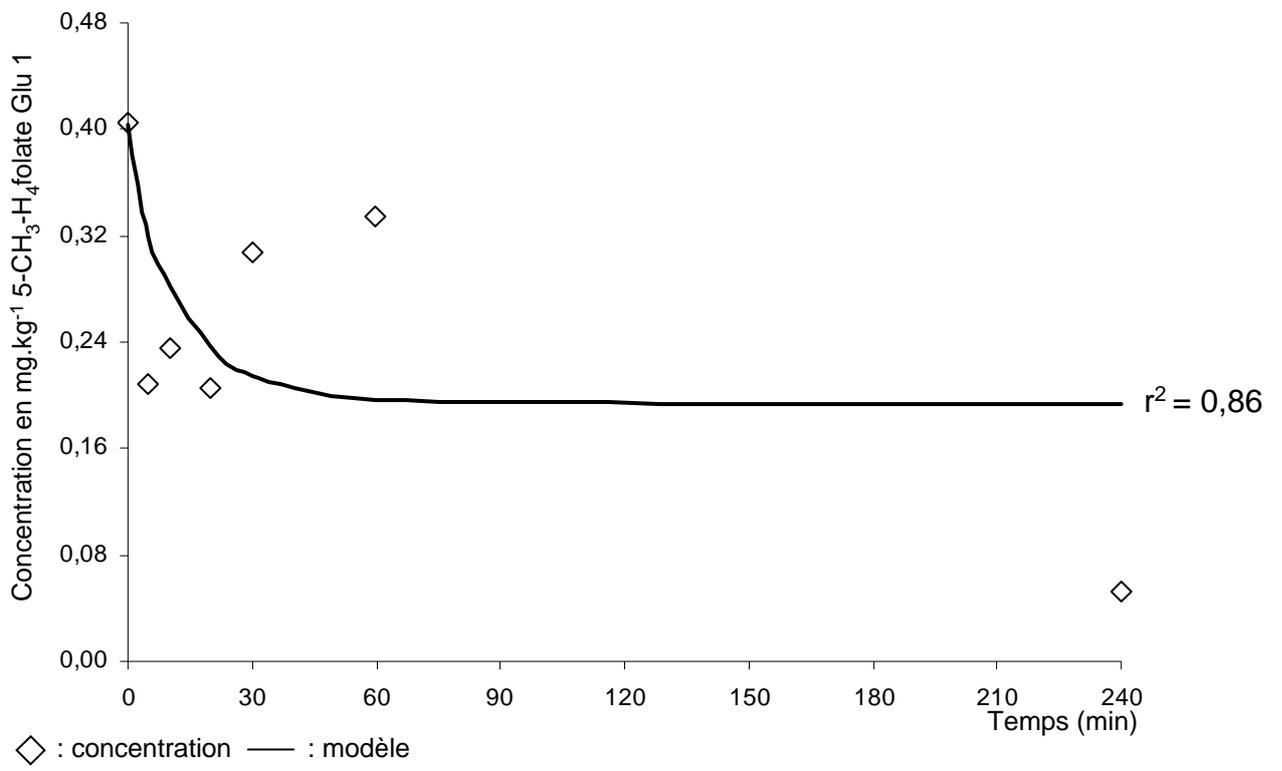
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 5 - 25 °C - Lot 1



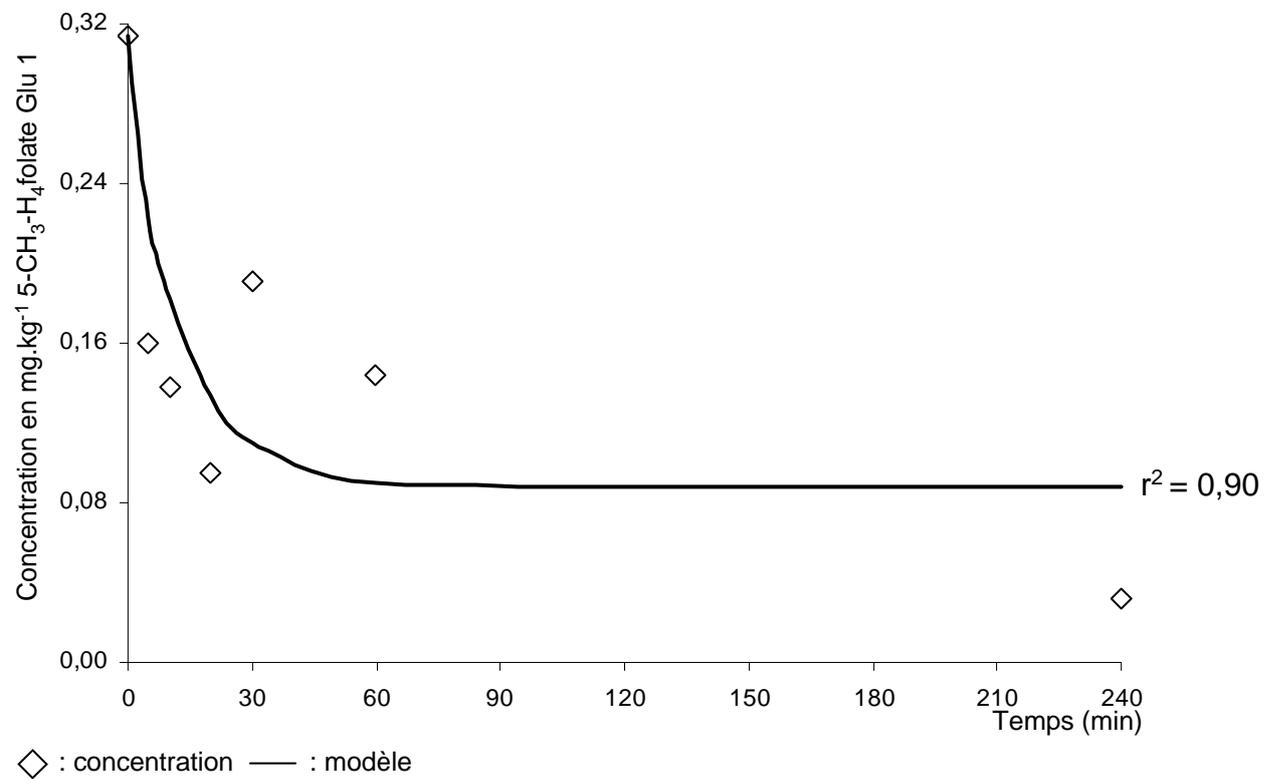
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 5 - 25 °C - Lot 2



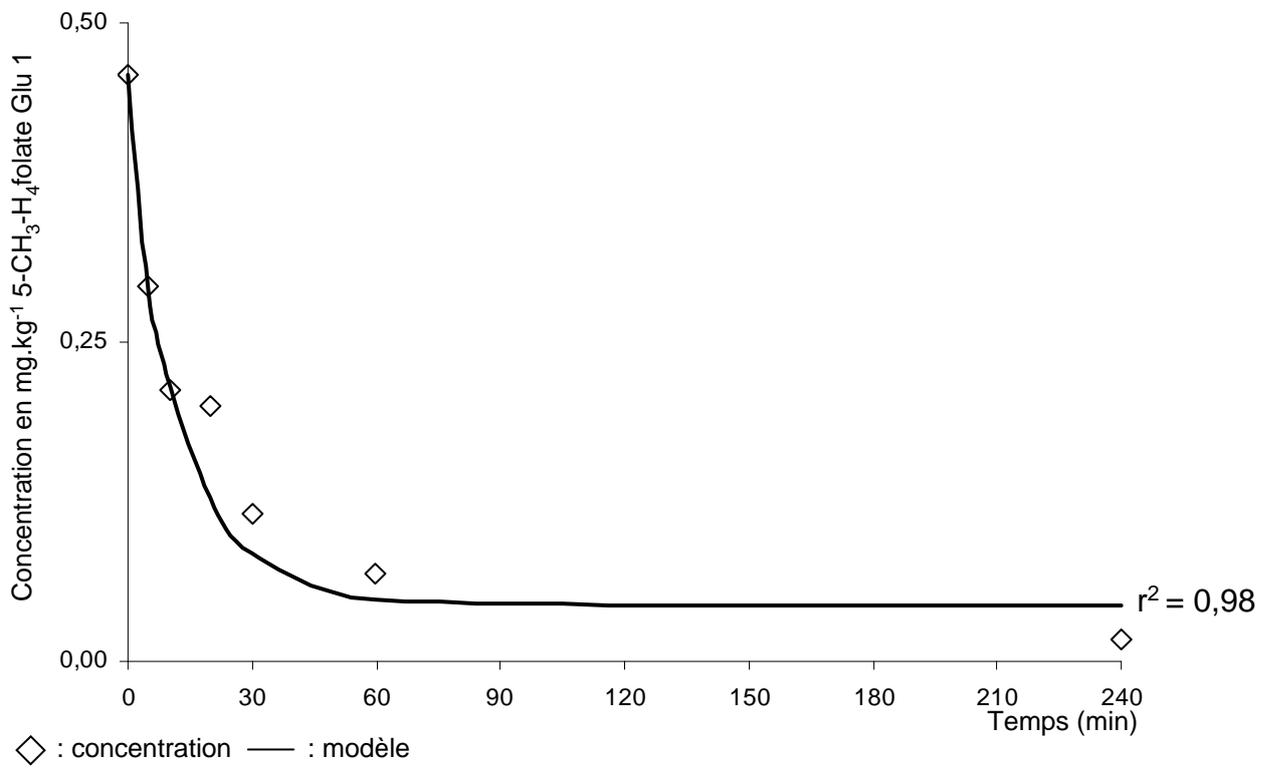
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 5 - 45 °C - Lot 1



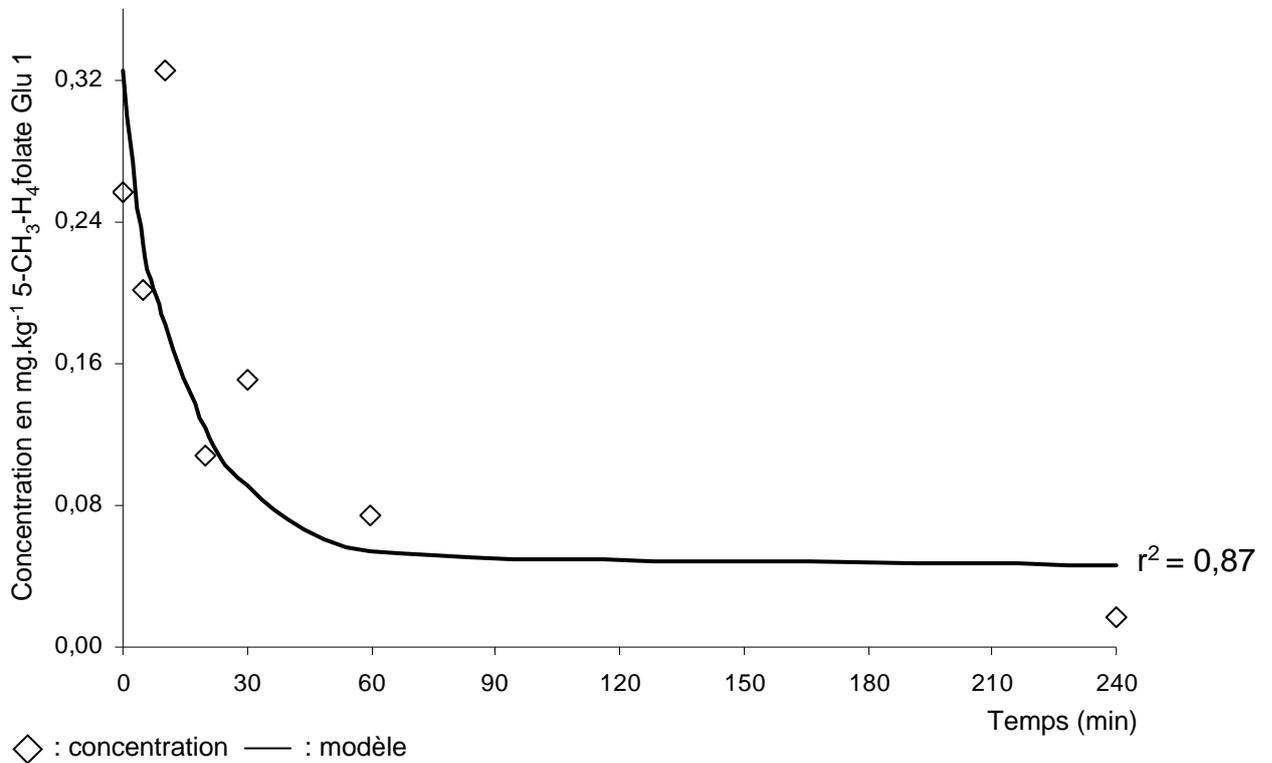
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 5 - 45 °C - Lot 2



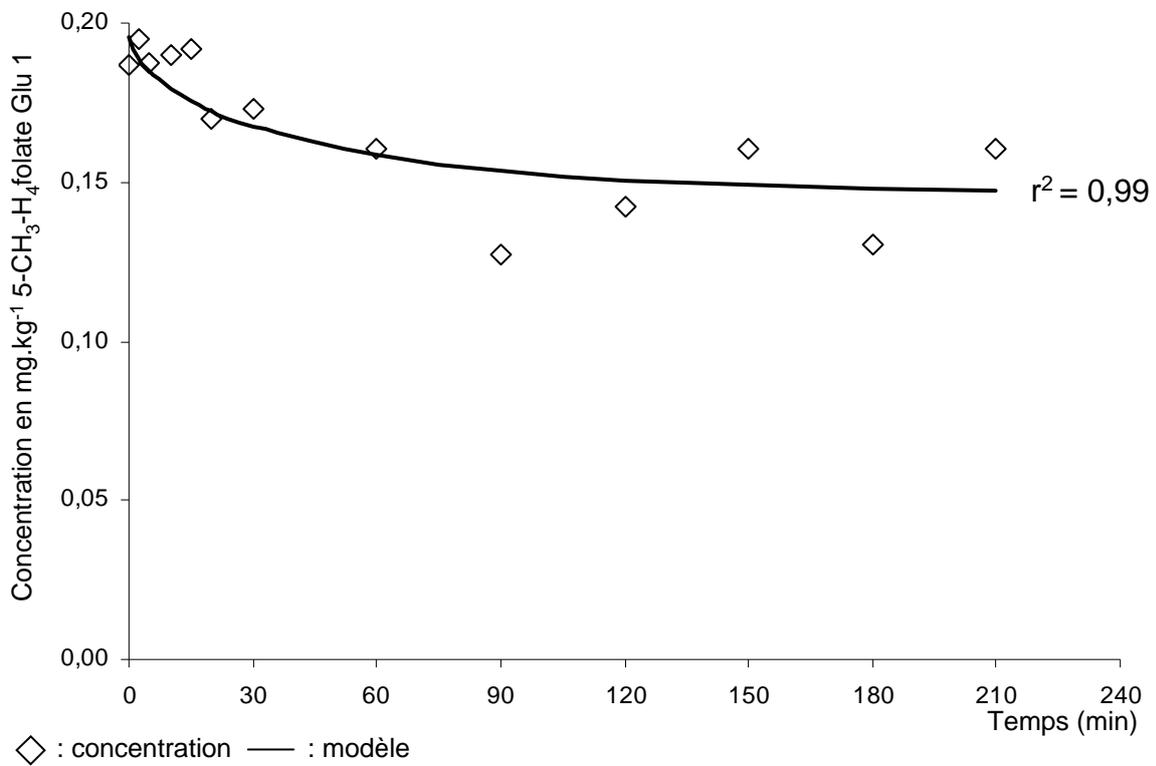
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 5 - 65 °C - Lot 1



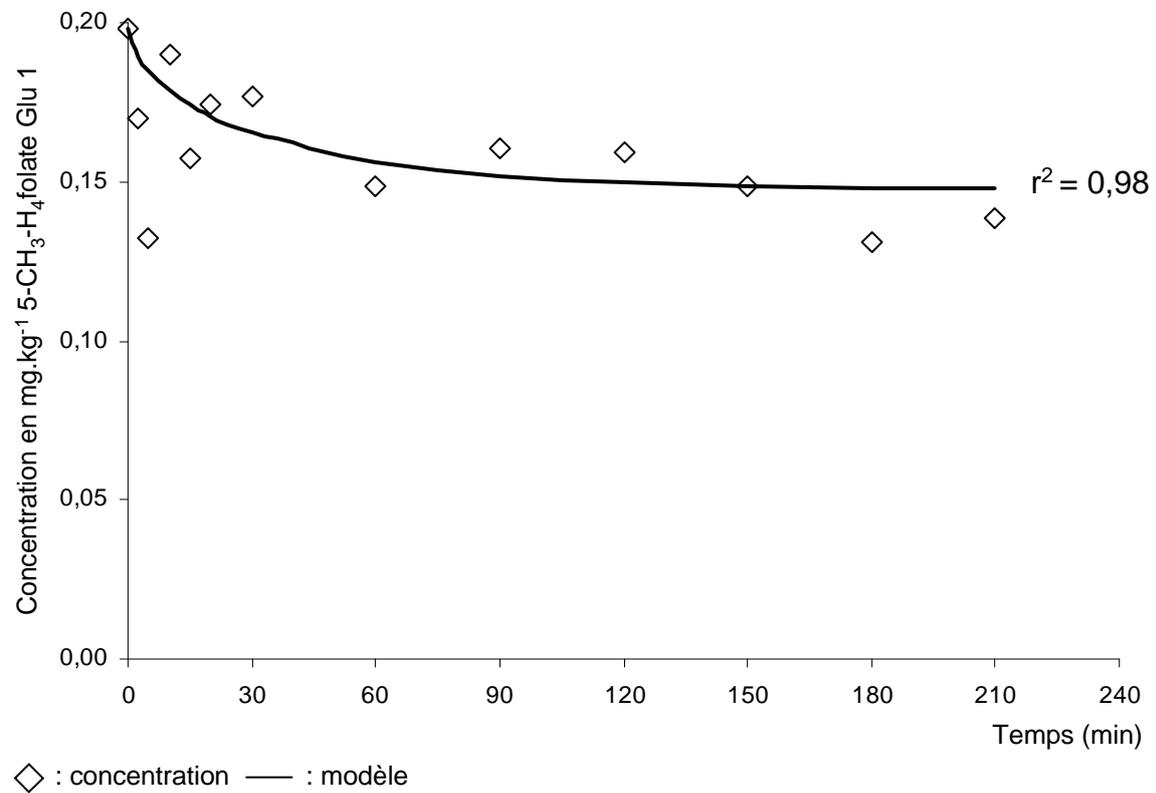
• Modélisation cinétique diffusion : Epinards - pH 5 - 65 °C - Lot 2



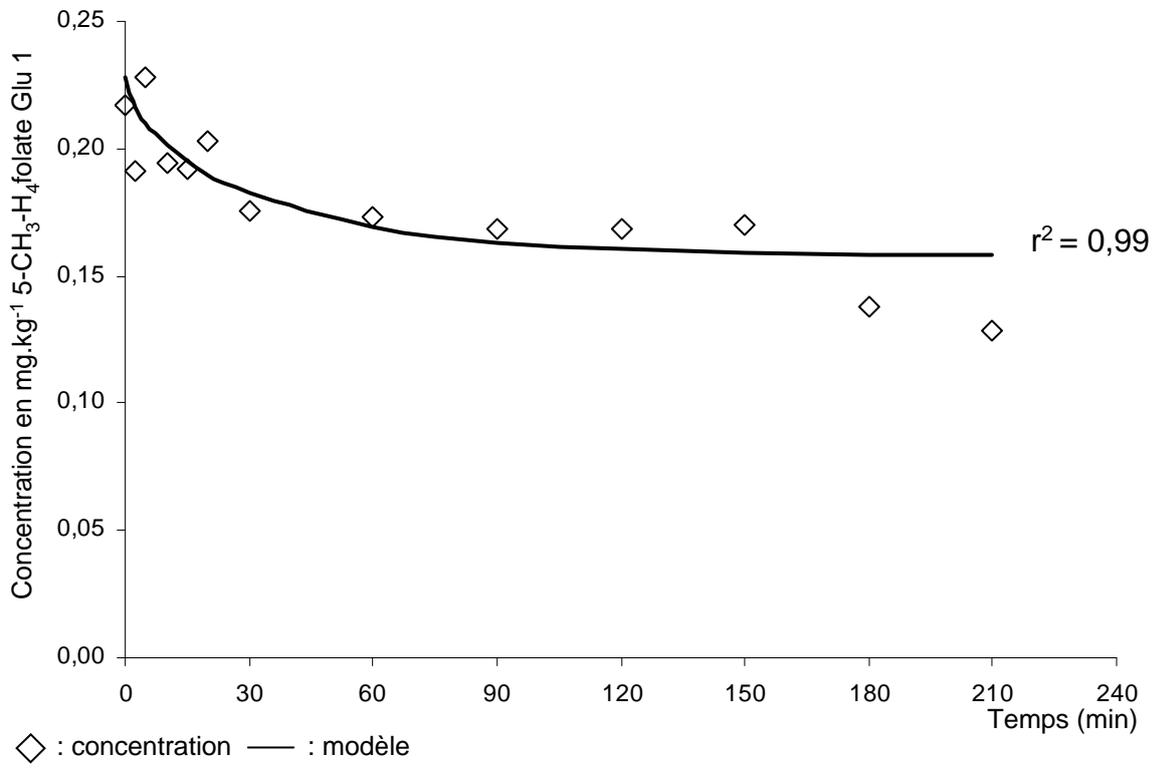
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 25 °C - Lot 1



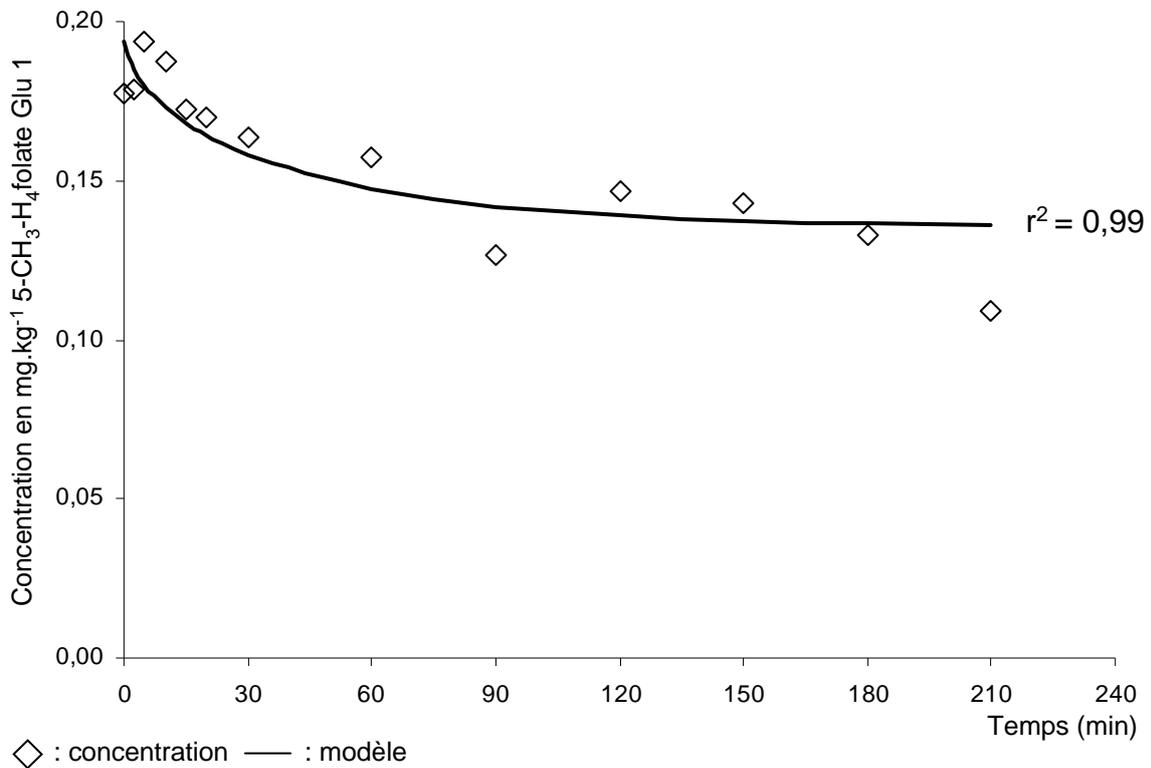
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 25 °C - Lot 1



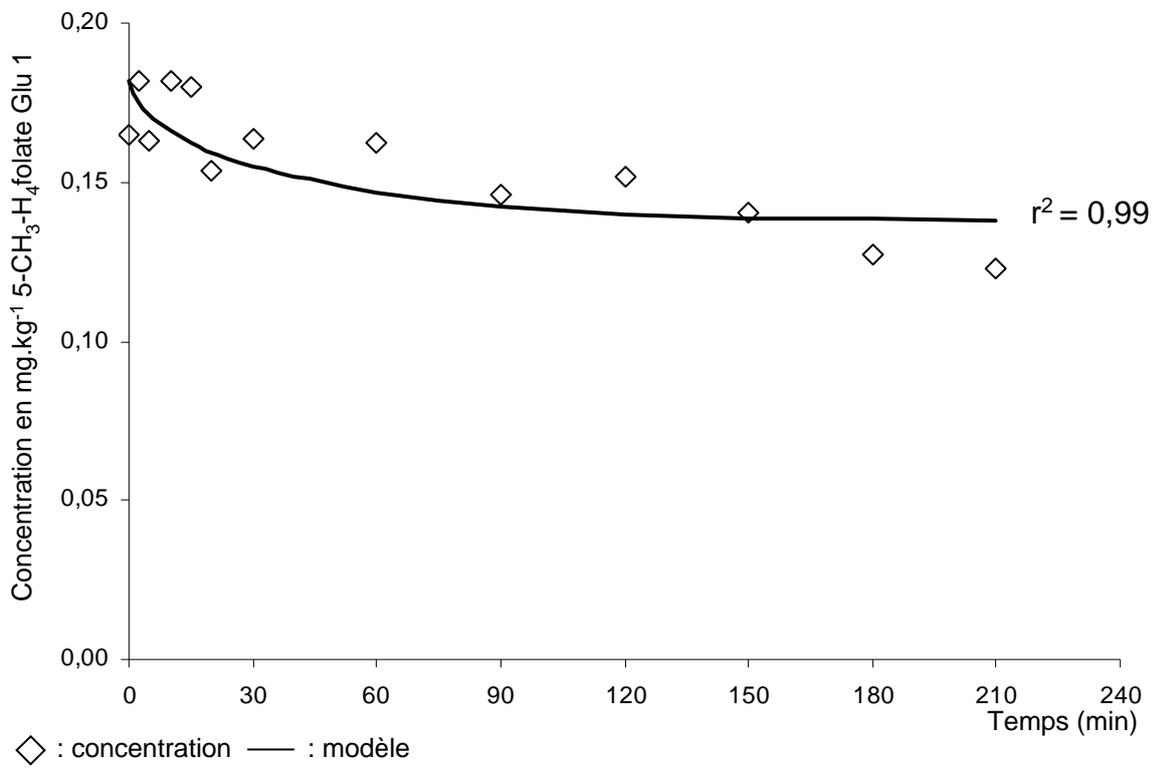
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 25 °C - Lot 3



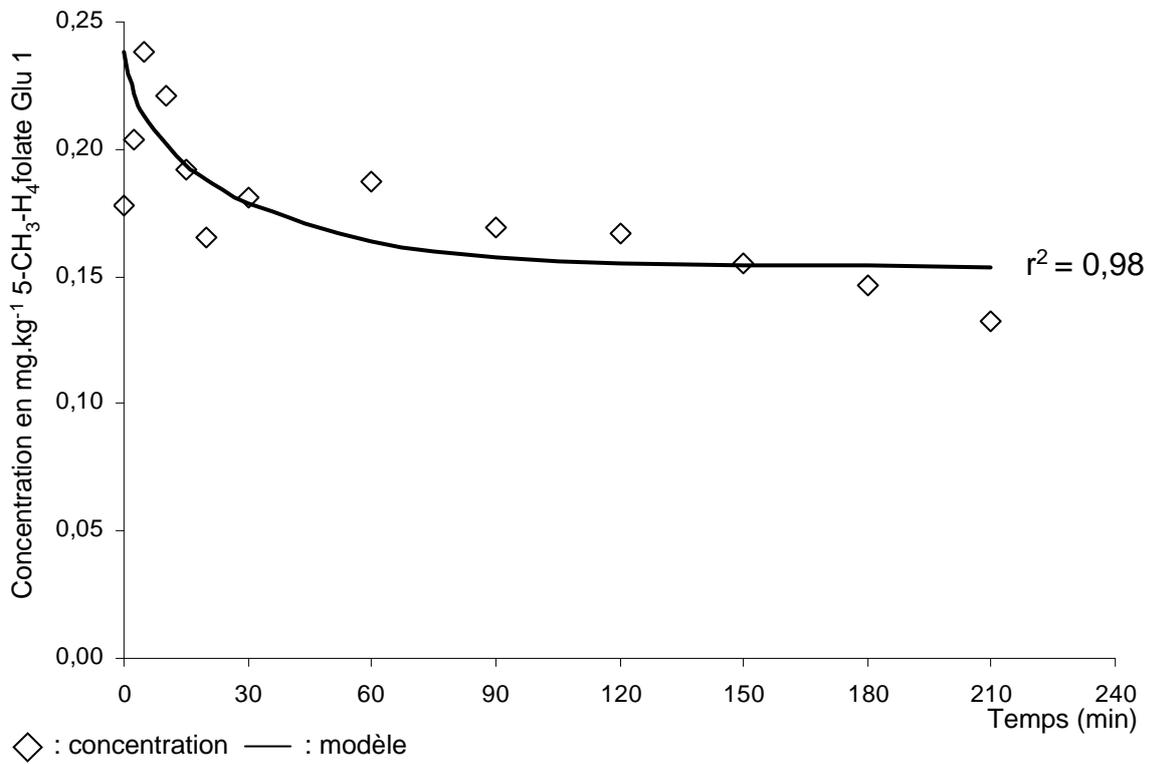
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 45 °C - Lot 1



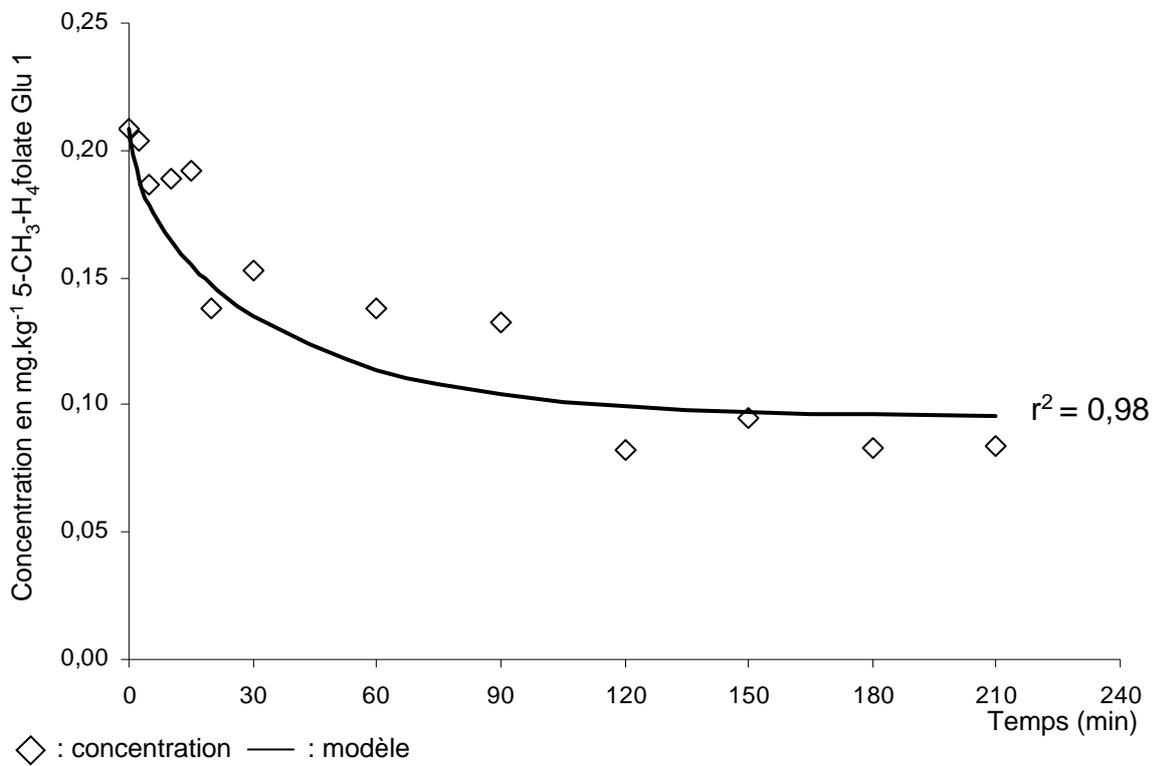
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 45 °C - Lot 2



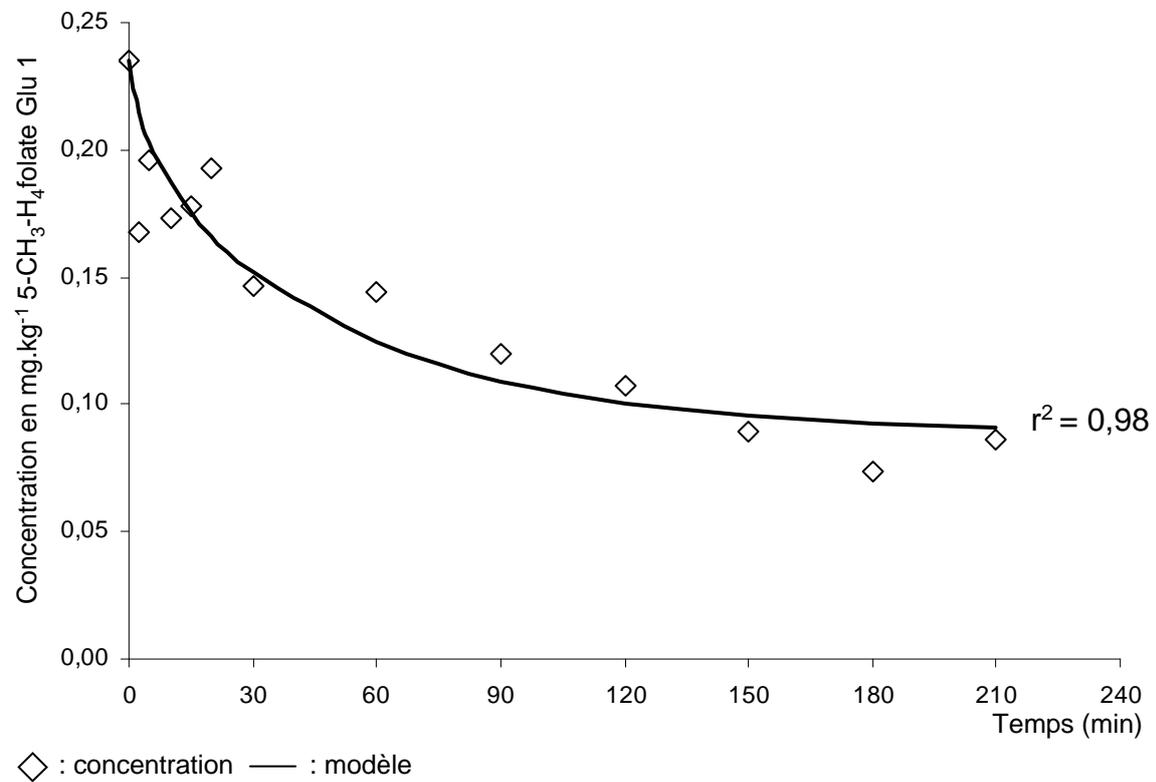
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 45 °C - Lot 3



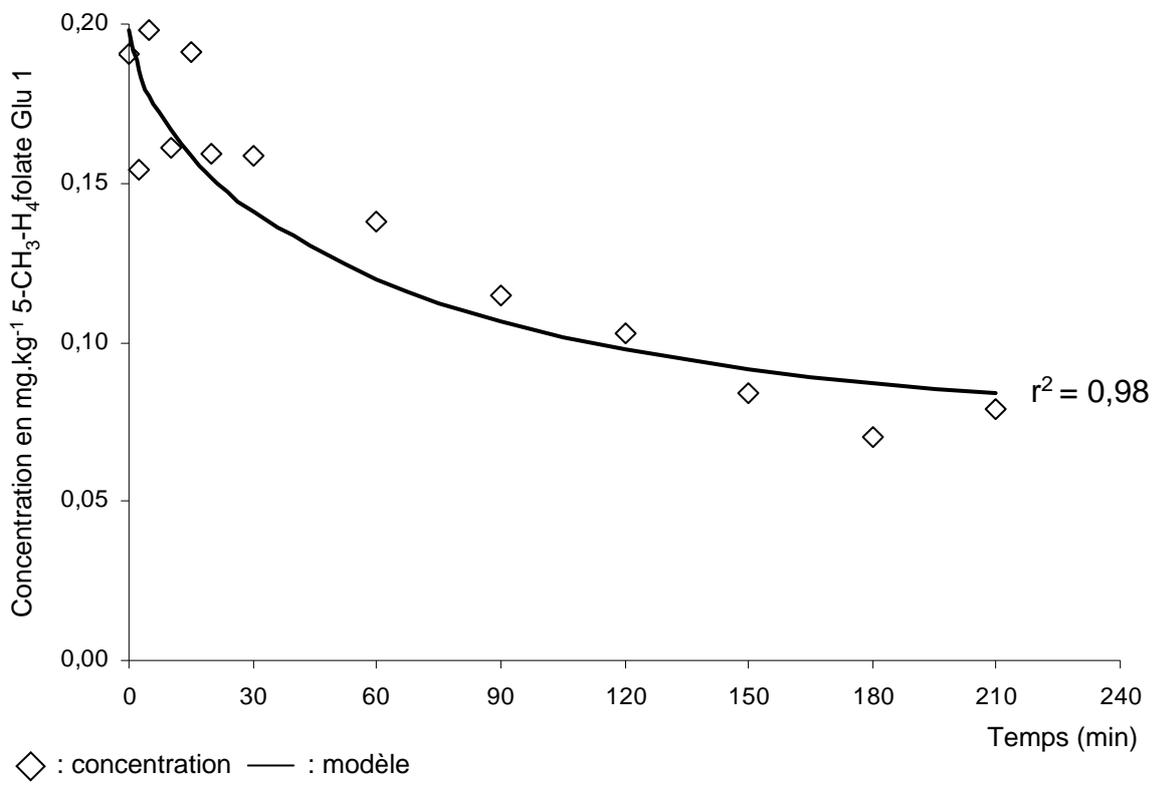
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 65 °C - Lot 1



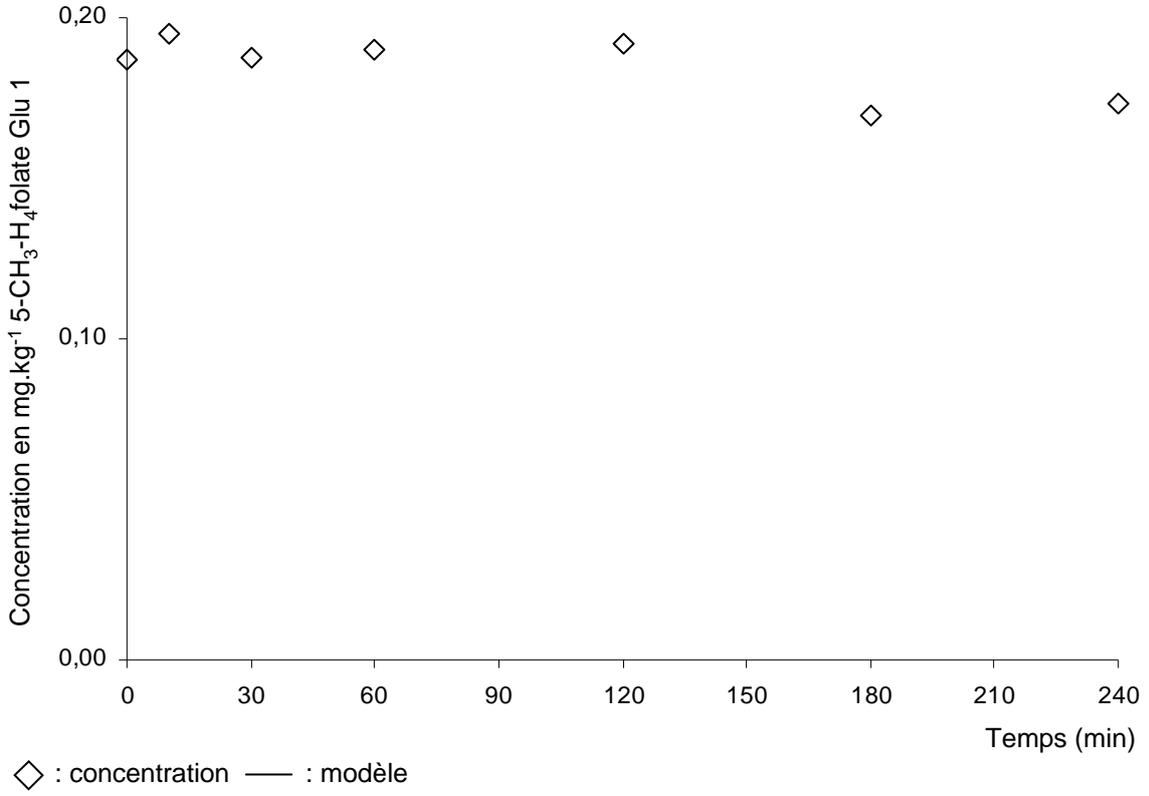
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 65 °C - Lot 2



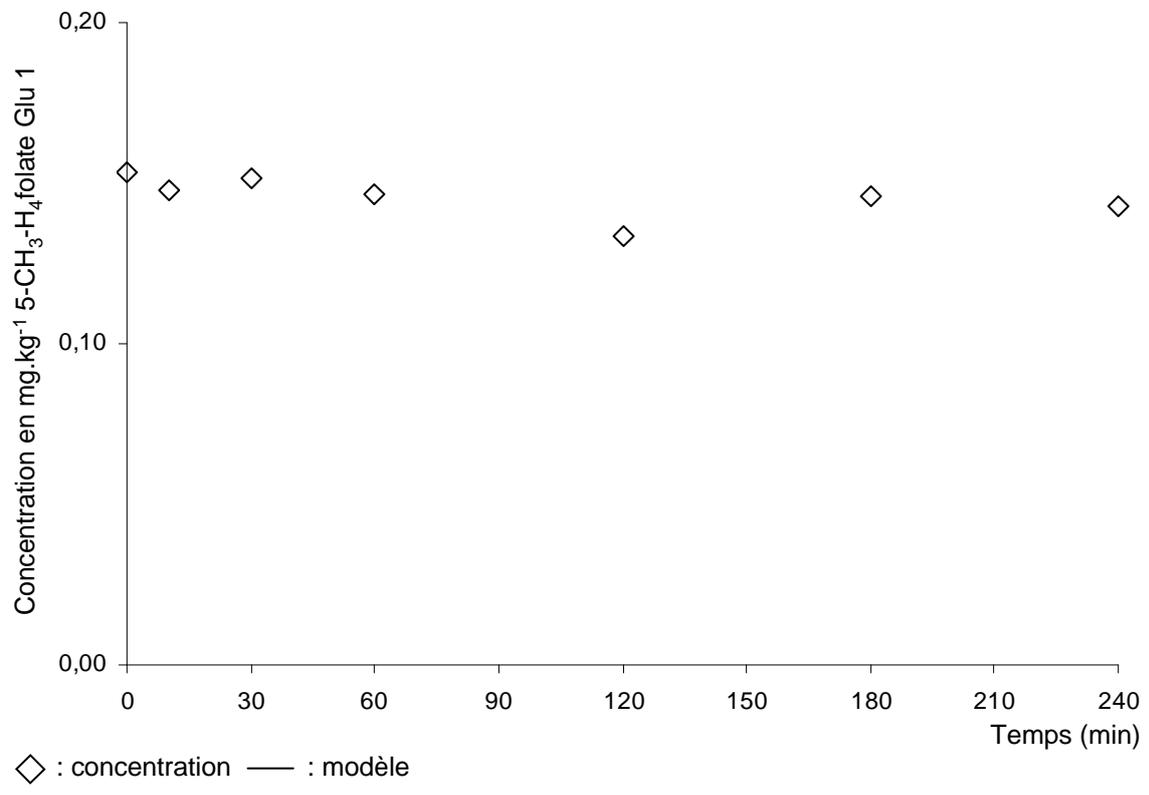
- Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 7 - 65 °C - Lot 3



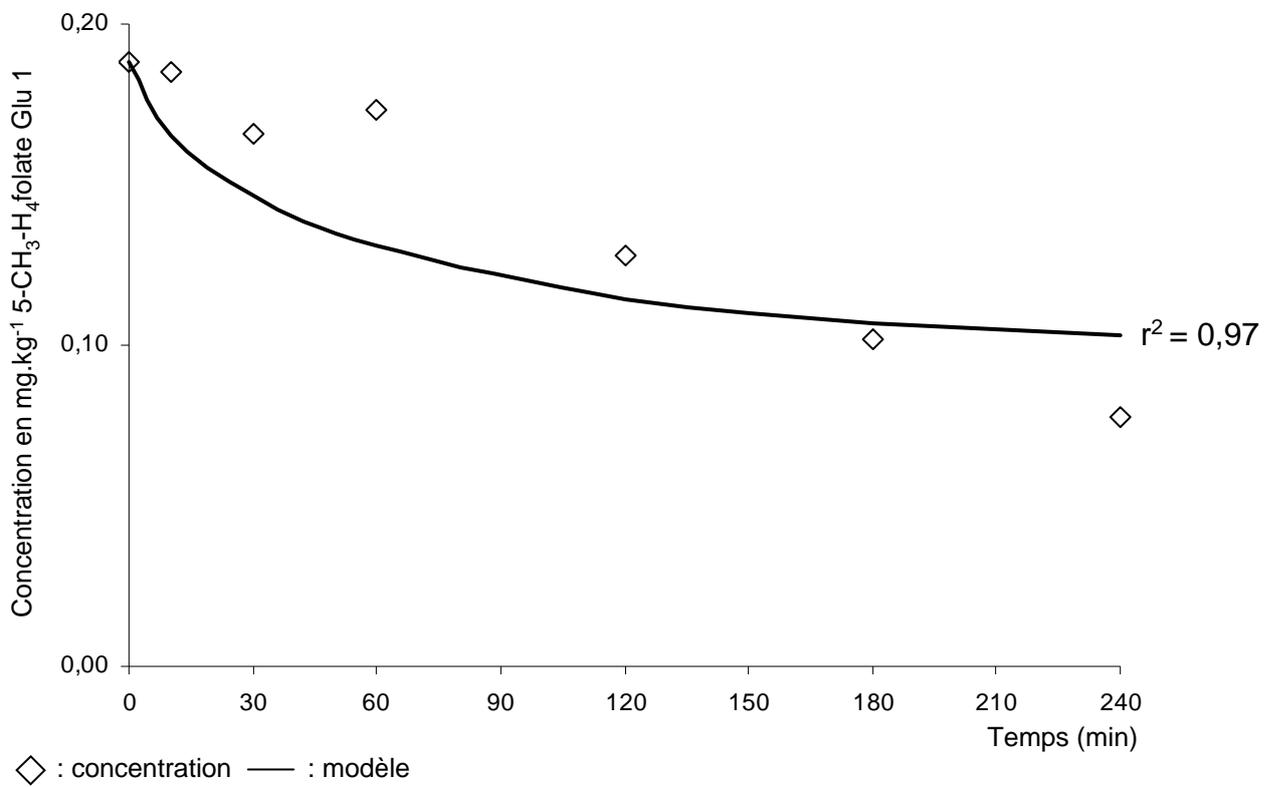
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 5 - 25 °C - Lot 1



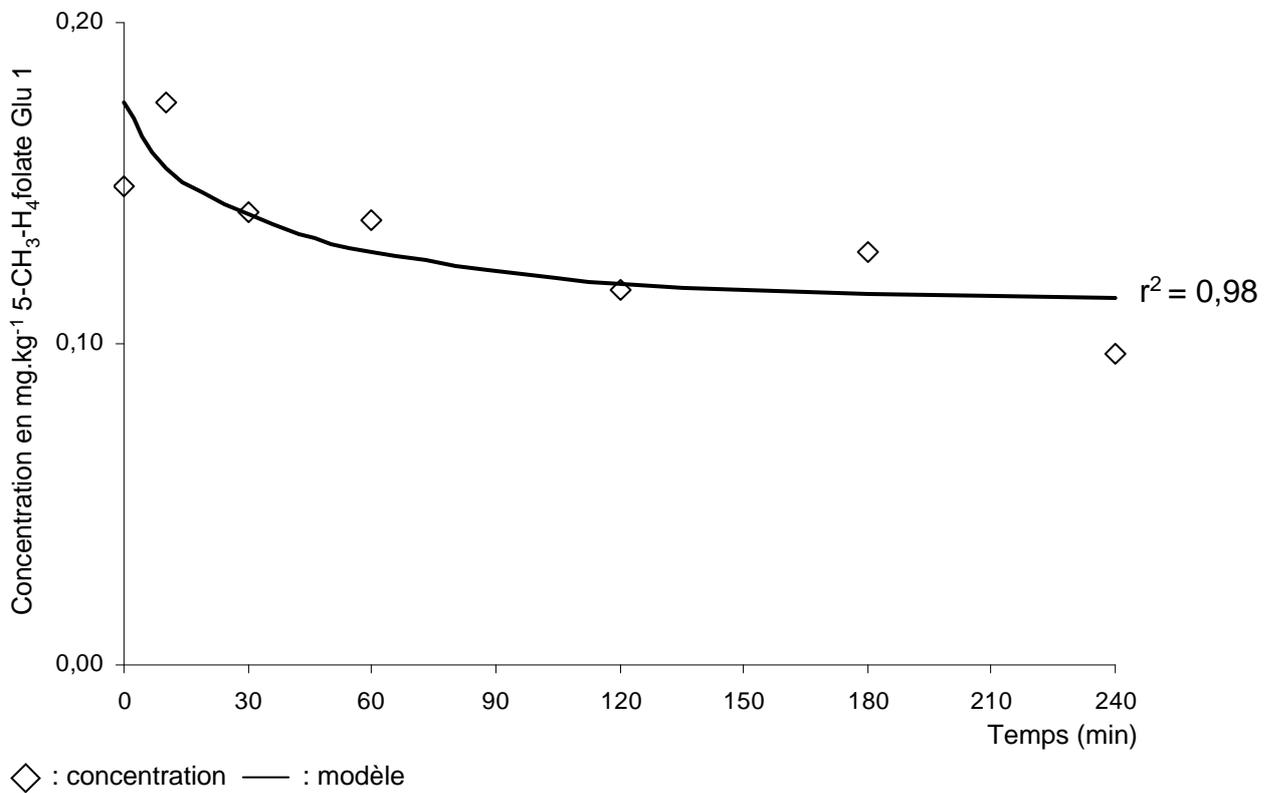
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 5 - 25 °C - Lot 2



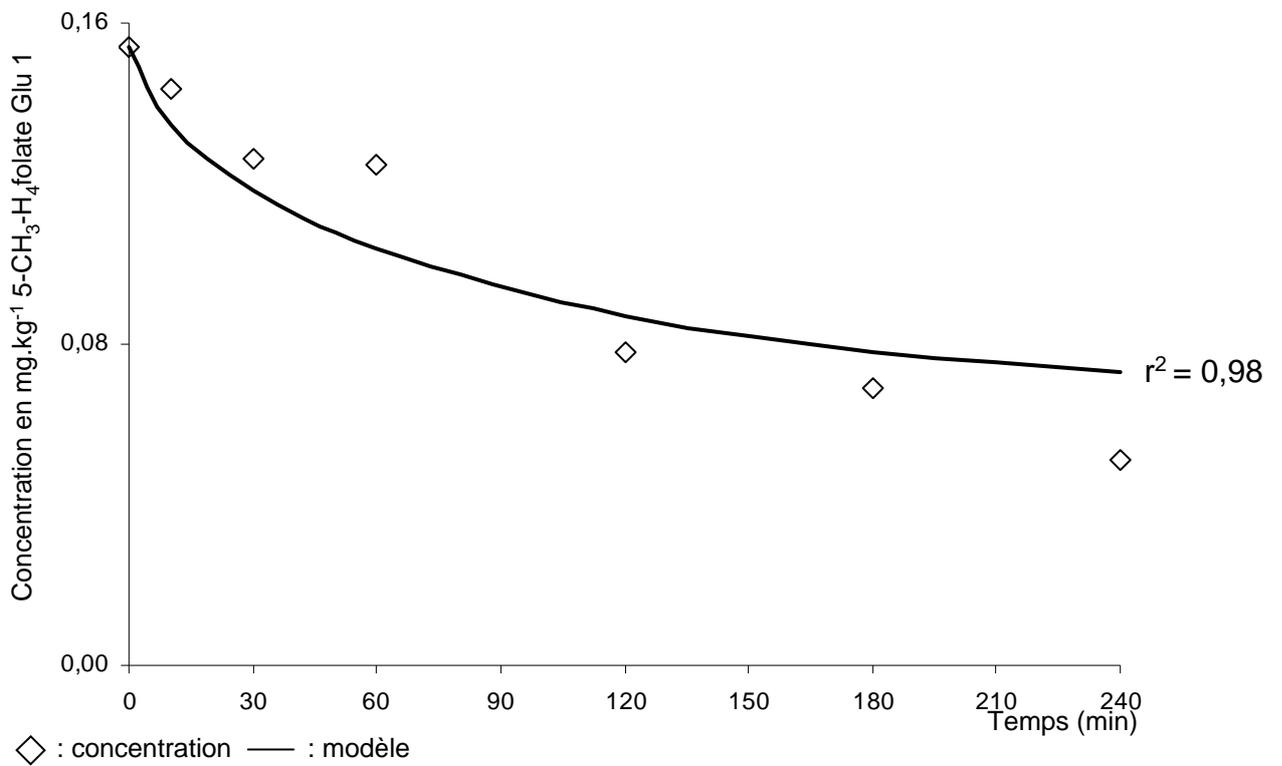
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 5 - 45 °C - Lot 1



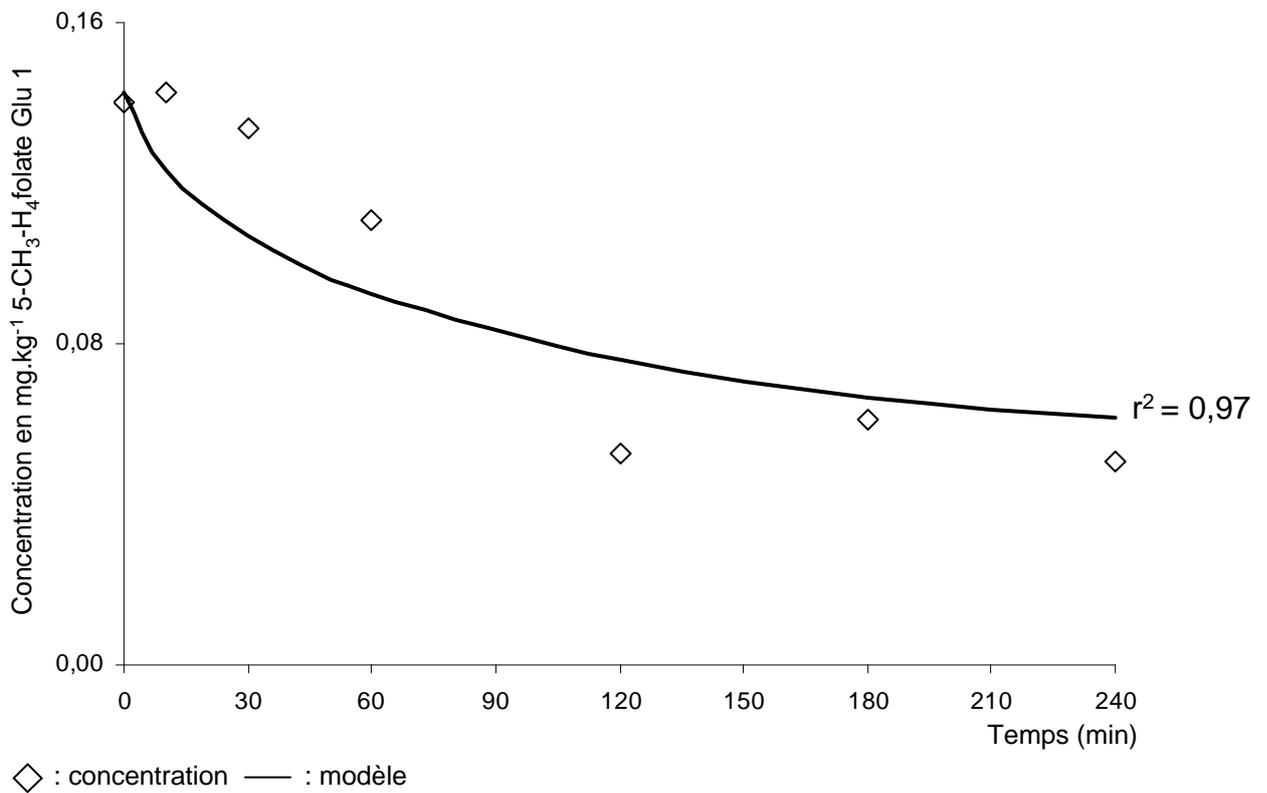
• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 5 - 45 °C - Lot 2



• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 5 - 65 °C - Lot 1



• Modélisation cinétique diffusion : Haricots verts - pH 5 - 65 °C - Lot 2



Devenir des folates au cours de la transformation des végétaux verts : identification des points clés et des mécanismes

Les folates sont des vitamines hydrosolubles, impliqués dans la limitation d'apparition de pathologies telles que les anomalies de fermeture du tube neural. L'Homme est dépendant de son alimentation pour couvrir ses besoins en folates. Les légumes sont une des sources importantes de folates. Dans un même temps, les légumes verts sont principalement consommés à partir de produits transformés, cuits, surgelés ou appertisés. Il est donc important de maîtriser les paramètres de la transformation afin de préserver au mieux les teneurs finales en folates. L'objectif de ce travail a donc été d'identifier l'impact du procédé de transformation (industriel et domestique) sur la perte en folates. Deux procédés industriels ont été étudiés : la surgélation des épinards et l'appertisation des haricots verts, les traitements domestiques ont consisté en la cuisson de légume dans de l'eau à ébullition ou à la vapeur. Les traitements thermiques (blanchiment et cuisson vapeur) n'induisent pas de diminutions significatives de la concentration en folates. En revanche, des pertes sont observées lorsque les légumes sont en contact étroit avec l'eau. Cette étude a permis de mettre à jour deux mécanismes de perte, la diffusion et la dégradation thermique. La diffusion des folates a été étudiée à l'échelle du laboratoire, les constantes de diffusion des folates ont été déterminées. La diffusion est largement influencée par la matrice elle-même, plus que par la température ou le pH. La part de la dégradation thermique, et notamment l'oxydation, ne peut être exclue au cours de la diffusion. C'est pourquoi des cinétiques de dégradation ont été réalisées à différentes température et différentes teneurs en oxygène, à partir de purées d'épinards et de haricots verts ainsi que sur des solutions modèles. L'oxygène joue un rôle important dans la dégradation chimique, notamment dans les solutions modèle. Les matrices végétales constitueraient donc une barrière à l'oxydation des folates. Les folates sont globalement assez bien conservés au cours du procédé de transformation. Une des pistes de recherche qui prendrait un sens dans la continuité de ce travail serait l'étude de l'impact des procédés de transformation sur la bioaccessibilité des folates.

Mots clés : Epinards, Haricots verts ; Traitements thermiques ; Procédés ; Diffusion ; Oxydation ; Cinétiques.

Fate of folates during vegetables processing : identification of key points and mechanisms

Folates are water-soluble vitamins, involved in the limitation of diseases such as neural tube defects. Man is dependent on his food to cover its folates' needs. Fruits and vegetables, particularly green vegetables are one of the major dietary sources of folates. In the same time, green vegetables are mainly consumed as processed products, cooked frozen or canned. It is therefore important to control processing parameters in order to preserve folates content in final products. The aim of this study was to identify the impact of processing (industrial and domestic) on folates loss. Two industrial processing chains were studied: spinach freezing chain and green beans canning chain, home treatments consisted in vegetables boiling or steaming. Thermal treatments (blanching and steaming) did not induce a significant decrease in folates concentrations. In contrast, losses were observed when vegetables were in close contact with the water. This study identifies two mechanisms of losses, leaching and thermal degradation. Folates diffusion was studied on a laboratory scale, the diffusion constants for folates were determined. Diffusion was more influenced by the matrix, than by temperature or pH. Some of thermal degradation, including oxidation, can not be excluded during leaching experiments. Degradation kinetics were performed at different temperature, with different oxygen contents, from spinach and green beans puree as well as model solutions. Oxygen plays an important role in chemical degradation, especially in model solutions. Plant matrix seemed to have protective effect, maybe as a barrier to oxygen. Folates are generally fairly well preserved during processing. One of the perspectives would be the study of the impact of processing on folates bioaccessibility.

Keywords : Folates ; Spinach ; Green beans ; Thermal treatments ; Process ; Diffusion ; Oxidation ; Kinetics.

