

Influence des produits de Réaction de Maillard sur la fermentation alcoolique

Yang Hee Lee

Institut Coréen de Sciences et de Technologie Séoul, Corée

Léon Petit

Station des Biochimie des Céréales. I.N.R.A. 91-Massy, FRANCE

마이야르反應 生成物의 酒精醱酵에 미치는 영향

李 陽 熙

韓國科學技術研究所

레온 페티

佛蘭西 國立農業研究院 穀類生化學研究所

(1968. 7. 20 受理)

要 約

Maillard 反應에서 生成된 可溶性 混合物質 “Prémélanoïdines”의 *Saccharomyces cerevisiae*에 依한 酒精醱酵에 미치는 生理的 影響에 關해서 관찰하였다.

Prémélanoidines 은 포도당과 Glycine의 水溶液을 90°C에서 1~48時間 加熱함으로써 얻었으며 이의 酒精醱酵에 미치는 生理的 影響은 Micro-Warburg를 使用하여 酒精醱酵 過程中 發生되는 CO₂의 量을 測定함으로써 醱酵速度의 促進여부를 決定하였다.

實驗結果를 綜合해 보면, Prémélanoidines 은 酵母에 依한 酒精醱酵의 速度를 促進하는 結果를 나타냈으며 이 促進現象은 어느 限界內에서 醱酵배지에 含有된 Prémélanoidines의 量에 比例하여 增加한다. 또한 이 Prémélanoidines의 活性은 特히 醱酵의 初期에 限하여 作用하는것을 알 수 있었다.

Introduction

En 1912, MAILLARD a décrit de façon méthodique, pour la première fois, la réaction de formation des mélanoïdines à partir des acides aminés et des sucres réducteurs en solution. Cette réaction se traduit par un phénomène de brunissement: la coloration s'intensifie progressivement et au bout d'un chauffage suffisamment long, un pigment noir, qui est nommé “mélanoïdines”, précipite. La

réaction de Maillard ne se limite pas seulement aux sucres réducteurs et aux amino-acides; généralement, on donne ce nom à toutes les réactions qui se produisent entre les glucides réducteurs et les protides à différentes hydratations à température élevée ou ambiante.

Depuis les travaux de MAILLARD, nombreux travaux ont été effectués sur la physico-chimie de la réaction et ces travaux se trouvent rassemblés dans plusieurs revues bibliographiques: ENDERS (1938), STADTMAN (1948), DANEHY et PIGMAN (1951), HODGE (1953), ELLIS (1953), et REYNOLDS (1963) mais différents phénomènes correspondent à des conditions différentes et les nombreux corps formés au cours de la réaction sont très loin d'être identifiés.

Sans nous attacher aux aspects physico-chimiques de la réaction de Maillard, nous noterons son importance, surtout dans le domaine de l'alimentation, car la plupart des produits alimentaires renferment des glucides, des protides et de l'eau en quantité variable. Par ailleurs, ils sont l'objet, avant leur consommation, soit de traitements thermiques, soit d'une conservation prolongée.

Pour l'alimentation humaine, non seulement la valeur nutritionnelle, mais encore l'aspect, le goût et l'arôme des produits jouent un rôle important; à ce point de vue, la réaction de Maillard donne

parfois de bons résultats (par exemple un pain convenablement cuit), mais dans bien des cas, nous trouvons des effets non désirables comme la perte de valeur nutritionnelle ou l'altération du goût et de l'aspect.

De nombreux travaux ont été effectués concernant les altérations des produits alimentaires dans diverses conditions par la réaction de Maillard: PATTON (1947), PATTON et HILL (1948) ont constaté que certains amino-acides indispensables sont inactivés par l'autoclavage en présence de glucose, LEA et HANNAN (1950) ont montré que la lysine perd son activité biologique lorsqu'elle est combinée au lactose, FRIEDMAN et KLINE (1950) ont remarqué que la réaction de Maillard provoque une diminution de la valeur nutritive des hydrolysats de protéines; CREMER et MENDEN (1956) ont indiqué que l'interaction entre les protéines et les sucres conduit à une diminution de la valeur biologique des produits. JONES (1959) a étudié la perte par réaction de Maillard des amino-acides et des sucres des extraits de morue lyophilisés; TAEUFEL et al. (1961) ont trouvé une relation entre l'intensité de brunissement et la décroissance de la valeur nutritionnelle des produits pendant la réaction de Maillard. LINKO et JOHNSON (1963) ont étudié les altérations des amino-acides et la formation des composés carbonylés penant la panification. JACQUOT et ABRAHAM (1965) ont étudié l'influence des traitements industriels et ménagers sur la valeur nutritive des aliments protidiques. HACKER et al. (1965), MILNER et WOODF-ORME (1965) ont constaté la perte de la valeur nutritive du lait de soja et du blé par un traitement thermique; MAURON et BLANC (1965) ont indiqué l'effet des traitements industriels sur la structure des protéines du lactosérum et DVORAK et VOG NAROVA (1965) ont étudié l'effet de la réaction Maillard sur la qualité biologique de la viande.

Mais, en dehors de cet aspect technologique de la question, on peut se demander quels sont les comportements physiologiques de ces corps nouveaux formés au cours de la réaction. Dans ce domaine-ci, il n'y a que peu de recherches et les quelques travaux que nous trouvons portent surtout sur leur influence sur les microorganismes: DIERZ-

BICKI (1909) a constaté que non les mélanoidines mais les substances humiques, composés ayant des propriétés physico-chimiques voisines de celles des mélanoidines, ont un effet favorable sur la croissance de la levure et sur la fermentation alcoolique. PETERSON et al. (1949) ont indiqué que les produits de la réaction de Maillard peuvent inhiber la croissance de *Bacillus polymyxa*; CHELDELIN et KING (1953) ont montré que le N-glycoside, produit du premier stade de la réaction glucose-glycocolle, peut activer la croissance de *Lactobacillus Gayoni*. ZABRODSKIJ et TIKHOMIROVA (1958) ont constaté que les mélanoidines peuvent inhiber le développement des moisissures et des bactéries et KIJIMA (1962) a indiqué que les mélanoidines contenues dans le moût de brasserie peuvent provoquer une floculation de la levure. De leur côté, SHEIKH, PETIT et GODON (1960-1961) ont étudié l'influence des produits de réaction de Maillard sur la fermentation alcoolique et le développement de la levure; ils ont trouvé que les produits de réaction de Maillard, préparés à partir d'un mélange molaire de glucose et de glycocolle chauffés entre 1 heure et 48 heures à 90°C, accélèrent dans une certaine mesure la vitesse de la fermentation alcoolique par rapport au mélange de glucose et de glycocolle initial qui n'est pas chauffé, ceci en mesurant la quantité de gaz carbonique dégagé. De même, JEMMALI et PETIT (1965) ont étudié l'influence des prémélanoidines sur les ferments lactiques et les ferments citriques de différentes souches et ils ont observé, surtout pour les ferments citriques un effet sensible des prémélanoidines sur la vitesse de production d'acide et de mycélium.

En dehors de l'étude des effets physiologiques des prémélanoidines sur les microorganismes, JEMMALI et PETIT (1965) ont examiné leur action sur les enzymes obtenues à partir des extraits des microorganismes, en supposant que l'effet observé des prémélanoidines sur les microorganismes est dû à leur action enzymatiques microbiennes; ils ont travaillé sur la pyruvate décarboxylase et la lactate décarboxylase oxydative isolée à partir du mycélium d' *Aspergillus wentii*. Ils ont observé une activation notable de la décarboxylase des levures due aux prémélanoidines, par suite d'une action

anti-inhibitrice.

Par ailleurs, ADRIAN et al. (1966) ont étudié les répercussions nutritionnelles des produits solubles formés au cours de la réaction de Maillard sur les rats et comment l'introduction de prémélanoïdines dans une ration équilibrée se traduit chez le rat en croissance: à "faibles doses, elles augmentent la consommation alimentaire et par là même le taux de croissance de l'animal; à doses plus élevées, elles diminuent nettement l'utilisation protidique de la ration, ce qui entraîne une chute de la vitesse de croissance: ces phénomènes tendent à s'estomper lorsque les animaux ont dépassé le stade de la croissance la plus intense."

Tous ces phénomènes observés par plusieurs auteurs sur les microorganismes, sur les enzymes et sur l'animal supérieur confirment que parmi les corps nouveaux formés au cours de la réaction de Maillard, il y a certainement quelques substances qui sont responsables de ces comportements physiologiques. On peut se demander alors quelles peuvent être les substances responsables de ces activations et en reprenant le réactif de SHEIKH, la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, nous avons poussé nos recherches sur la fermentation alcoolique en essayant d'isoler du mélange complexe, les substances activatrices par différentes techniques de fractionnement.

Dans ce rubrique, nous limitons seulement à l'observation de l'activité globale de différentes préparations de prémélanoïdines de glucose et de glyocolle sur la fermentation alcoolique. Les produits solubles formés au cours du chauffage d'une solution mixte d'acides aminés et de sucres sont dénommées "prémélanoïdines" par opposition aux mélanoïdines insolubles représentant l'ultime stade de la réaction de Maillard.

Méthodes expérimentales

1. Préparation des prémélanoïdines.

Les prémélanoïdines ont été préparées à partir de solutions de glucose et de glyocolle de molarité 2 M en introduisant des volumes égaux de chaque solution dans un tube rodé; le mélange est chauffé à reflux au bain-marie à 90°C pendant le temps nécessaire. Au cours du chauffage le pH du milieu

s'abaisse progressivement. Les prémélanoïdines préparées dans ces conditions sont appelées les prémélanoïdines en milieu ordinaire. Les prémélanoïdines en milieu neutre sont préparées en présence du carbonate de calcium en excès dans le milieu en vue d'éviter l'abaissement du pH au cours de la préparation. La préparation de prémélanoïdines en milieu pâteux est effectué avec un mélange de glucose et de glyocolle contenant 15 p. 100 d'eau distillée en poids en chauffant à 90°C pendant un temps compris entre 1 et 8 heures.

2. Test d'activité fermentaire

2.1. préparation de la levure

La levure utilisée pour effectuer le test de fermentation a été préparée à partir d'une culture de *Saccharomyces Cerevisiae* isolée d'un pain de levure commerciale entretenue sur le milieu solide. Il est apparu que la capacité fermentaire de la levure et sa sensibilité aux produits de la réaction de Maillard pouvaient être modifiées considérablement suivant les conditions de travail (âge, milieu, temps et mode de conservation, etc.); pour obtenir une levure régulière, on a donc entretenu et cultivé cette levure dans des conditions standardisées de température, de temps et de milieu de culture.

Après avoir étudié des milieux de compositions diverses, nous en avons finalement retenu deux, l'un pour entretien de la souche, l'autre pour cultiver la levure.

—Milieu d'entretien

malt (Difco)	2.0g
extrait de levure (Difco)	0.6g
péptone	1.5g
agar	5.0g
glucose	2.5g
eau	200ml

—Milieu de culture

malt (Difco)	2.0g
extrait de levure (Difco)	1.0g
péptone	1.8g
agar	4.5g
glucose	3.5g
eau	200ml

Les deux milieux sont autoclavés pendant 20mn, à 115°C.

L'acidification au pH 4.5 par l'addition d'acide lactique est nécessaire avant l'ensemencement. La souche est conservée en tube incliné au réfrigérateur et la culture est effectuée en boîte de Pétri à 28°C pendant 48 heures. La levure obtenue est recueillie et lavée trois fois à l'eau distillée et centrifugée 15 minutes entre chaque lavage. Elle est ensuite mise en suspension dans un volume d'eau distillée tel que la densité optique à 600 m μ soit de 0.680; la concentration en levure sèche est alors de 0.76 mg/ml.

2.2. Mode opératoire

2.2.1. Milieu de base

Le milieu de base utilisé pour la fermentation est entièrement identique à celui choisis par SHEIKH (1960); il correspond au milieu préconisé par l'Association of Official Agricultural Chemist pour le dosage de la thiamine par fermentation, à ceci près que les sels d'ammonium ont été remplacés par des sels de potassium et que l'hydrolysate de caséine a été omis. Il est, en effet, apparu par ailleurs (Petit, Godon; résultats non publiés) que c'est dans ces conditions de fermentation que les réactions de la levure aux prémélanoïdines étaient à la fois les plus nettes et les plus nuancées: si la présence de prémélanoïdines dans un tel milieu pauvre en azote peut provoquer, soit une accélération, soit un ralentissement de la vitesse de fermentation, on n'observe jamais que de faible inhibition lorsque la levure fermente dans un milieu contenant une source azotée facilement assimilable (sels d'ammonium, asparagine, hydrolysate de caséine) Dans ces conditions, on prépare les solutions suivantes:

—solution A

PO ₄ HK ₂	95g
PO ₄ H ₂ K	213g
vitamine P.P.	200mg
vitamine B ₆	4mg

On amène à 1000 ml et autoclavage.

—solution B

glucose	200g
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	7g
PO ₄ H ₂ K	2.2g
KCl	1.7g
Ca Cl ₂ . 2H ₂ O	0.5g
Fe Cl ₃ . 6H ₂ O	0.01g

Mn SO₄. 4H₂O

0.01g

On amène à 1000 ml et autoclavage.

—solution de thiamine; à 0.2 τ /ml.

Le milieu de base est préparé par mélange de ces trois solutions; dans une fiole jaugée à 20 ml, on introduit: 5 ml de solution A, 7.5 ml de solution B, 0.5 ml de solution de thiamine et on complète avec de l'eau distillée.

2.2.2. —Test de fermentation

On suit la fermentation en mesurant la vitesse de dégagement du gaz carbonique par la technique du Micro-Warburg; on introduit dans la fiole à fermentation, 1 ml du milieu de base, 0.5 ml de la solution en expérience, ou d'eau distillée pour le témoin, et dans le diverticule de cette fiole, 1 ml de la suspension de levure. Puis, on chasse l'air de la fiole par passage d'azote pendant 2 minutes pour réaliser les conditions d'anaérobiose; après mise en équilibre à température de 30°C dans le bain-marie de l'appareil, on mélange le contenu du diverticule et celui de la fiole. A différents stades de la fermentation (généralement après 3, 6, 22 heures) on fait les lectures; on calcule donc les vitesses de dégagement du gaz carbonique exprimées en microlitre par minute.

Dans certains cas, il peut être utile de rapporter la vitesse de fermentation V de la solution en expérience à celle V_T du témoin. Les valeurs du rapport V/V_T supérieures à 1 correspondent à une activation, celles inférieures à l'unité, à une inhibition.

Ici, il faut noter que le phénomène de fermentation varie largement, d'un jour à l'autre, bien que toutes les conditions soient standardisées. Les observations sont alors faites surtout par comparaison avec le témoin de chaque série.

Résultats et Discussion

Dix-huit types de prémélanoïdines différentes par niveaux d'avancement de la réaction de Maillard, par la concentration et par l'acidité du milieu, sont préparées en chauffant un mélange de glucose et de glycolle à 90°C durant un temps compris entre 1 et 48 heures.

On a utilisé une solution 0.2 M de ces préparations pour le test; l'activité fermentaire est observée

durant une heure après 3 heures de fermentation. L'activité est exprimée en V/V_T . (Fig. 1, 2 et 3)

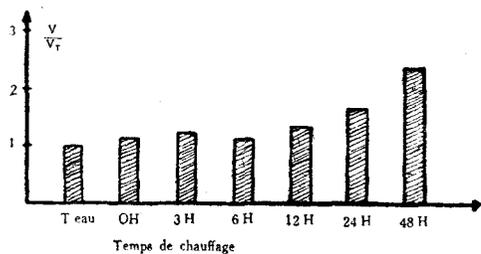


Fig. 1. Action des prémélanoïdines en milieu ordinaire après trois heures de fermentation

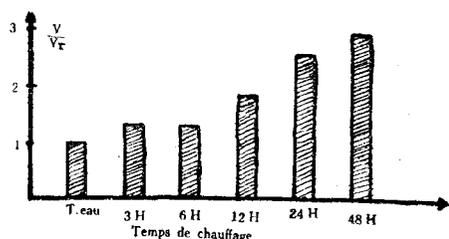


Fig. 2. Action des prémélanoïdines en milieu neutre après trois heures de fermentation

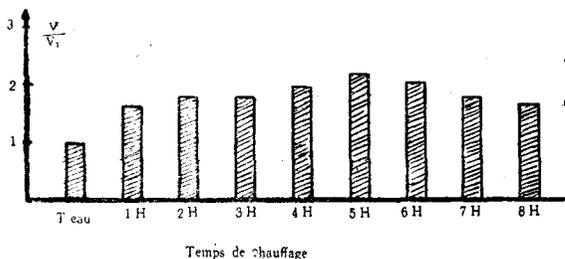


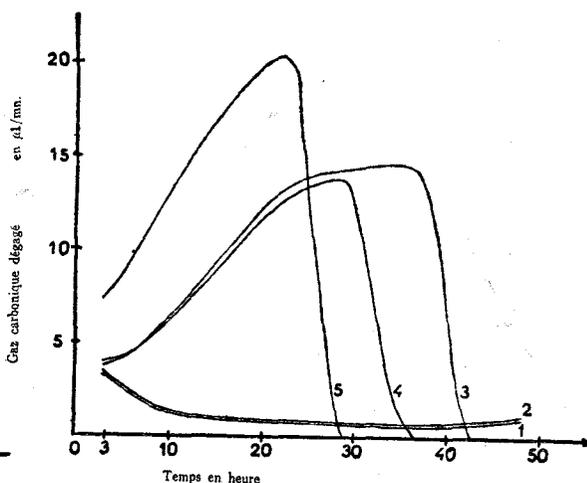
Fig. 3. Action des prémélanoïdines en milieu pâteux après trois heures de fermentation

Il apparaît que tous les types de prémélanoïdines ainsi que le mélange de glucose et de glycolle présentent une action supérieure à celle du témoin eau. Mais pour les prémélanoïdines de milieu ordinaire et celles de milieu neutre, lorsque les préparations ont subi moins de 12 heures de chauffage, l'action n'est que modérée. Elle est par contre très nette chez les prémélanoïdines chauffées plus de 24 heures, celles de 48 heures ayant une activité intense. Cela signifie que,

vraisemblablement, les corps actifs se forment proportionnellement à l'avancement de la réaction. On observe qu'en milieu neutre, la réaction de Maillard se développe plus rapidement qu'en milieu ordinaire, c'est-à-dire non neutralisé.

En milieu pâteux, la réaction de Maillard est très intense et au bout de 6 heures de chauffage, on remarque un début de précipitation des mélanoïdines. Aussi l'activité fermentaire se manifeste déjà très nettement dans la préparation de 1 heure de chauffage.

On a donc effectué un test de fermentation en mesurant la vitesse de dégagement du gaz carbonique toutes les trois heures pendant 45 heures. On a utilisé une solution 0.2 M des produits pour cette expérience. (Fig. 4).



- 1 : Témoin eau
- 2 : Glucose
- 3 : Mélange glucose-glycolle
- 4 : Glycolle
- 5 : Prémélanoïdine 48H

Fig. 4. Allure de fermentation en présence des Prémélanoïdines, du glucose et du glycolle

La Fig. 4 nous éclaire sur plusieurs points intéressants:

- Témoin eau (allure normale): la vitesse de dégagement diminue progressivement à partir de 3 heures jusqu'à 10 heures; puis un faible et constant dégagement de gaz carbonique se poursuit.
- Glucose: Il n'a pas d'effect activateur mais il

- prolonge la durée de fermentation.
- Glycocolle: Une activation forte et croissante se manifeste à partir de 6 heures; la fermentation est terminée au bout de 35 heures, le glucose ayant été complètement utilisé.
- Mélange de glucose et de glycocolle: On retrouve l'activation due au glycocolle, mais la durée de fermentation est plus longue en raison de la présence du glucose.
- Prémélanoïdines: on note déjà une forte activation au bout de 3 heures et l'activation reste intense et croît jusqu'à la fin. La fermentation se termine au bout de 30 heures.

Cela montre que l'activation observée à partir de 6 heures peut être attribuée au glycocolle, mais, l'activation du début de la fermentation doit être considérée comme étant due aux produits de la réaction de Maillard.

Nous avons encore observé l'intensité de l'action fermentaire des prémélanoïdines 48 heures à différentes concentrations afin d'expliquer les différences d'intensité de l'activité fermentaire des différentes prémélanoïdines qui renferment des quantités différentes de produits de la réaction de Maillard. Pour ce test, les activités sont observées à trois stades différents de la fermentation; à 3 heures, 6 heures et 22 heures, ces dernières mesures devant confirmer celles de 6 heures. (Tableau).

Tableau; Activité fermentaire des prémélanoïdines à différentes concentrations

Echantillons	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μ l/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
Témoin eau	2.98	2.03	1.01
P.M. 1 M	9.30	10.93	18.00
" 0.5 M	6.51	9.50	17.43
" 0.1 M	4.50	6.31	13.65
" 0.05 M	3.73	5.15	13.48
" 0.01 M	3.61	5.08	3.25
" 0.005 M	3.65	5.40	1.68
" 0.001 M	3.81	2.43	1.02
" 0.0005 M	3.30	2.35	1.02
" 0.0001 M	2.56	1.76	0.95
" 0.00005M	2.18	1.46	0.77

L'action des prémélanoïdines se manifestent nettement jusqu'à une concentration de 0.5 M et

même jusqu'à 0.005 M. Mais, dans les dernières, on remarque une faible action qui décroît à partir de la sixième heure de fermentation. L'intensité de l'activité fermentaire augmente en fonction de la concentration des produits de la réaction de Maillard.

Conclusion

Suivant les trois expériences précédentes, nous pouvons conclure que les produits de la réaction de Maillard ont un effet accélérateur sur la vitesse de la fermentation alcoolique et cet effet augmente suivant la concentration des produits de la réaction. Nous constatons encore que cette accélération se manifeste surtout en début de la fermentation.

Références Bibliographiques

- ADRIAN J., FRANGNE R., PETIT L., GODON B. et BARBIER J., *Ann. Nutr. Aliment.* **20**, (3), 257-277. (1966).
- CHEDELIN V.H., KING I.E., *Ann Rev. Microbio.*, **7**, 113. (1955).
- CREMER H.O., MENDEN E., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **104**, 33-43. (1956).
- DANEHY J., PIGMAN W.W., *Adv. Food Res.*, **3**, 241-290. (1951).
- DVORAK Z., VOGNAROVA I., *Prumysl. Potravin (Czech)* **16**, (4), 172-176 (1965).
- DZIERZBICKI A., *Anz. Akad. Wissensch. Krakau*, 651-660 (d'après *Biochem.* **9** 704). (1909).
- ELLIS G.P., *Adv. carb. chem.*, **14**, 63-136. (1959).
- ENDERS C., *Kolloid. Z.* **85**, 74-87. (1938)
- FRIEDMAN L. and KLING O.L., *J. Nutrition* **40**, 295. (1950).
- HACKLER L.R. et al., *J. Food Sci.*, **30**, n 4°, 723-28. (1965).
- HODGE J.E., *Agric. Food Chem.*, **1**, 928-943. (1953).
- JACQUOT R. et ABSAHAM J., *Bibliotheca Nutr. et Dieta.* **7**, 43-69. (1965).
- JEMMALI M. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de Paris (1965).
- JONES N.R., *Food Res.*, **24**, 704. (1959).
- KIJIMA M., *Brewers Digest.* **37**, n°11, 50-

55. (1962).
- 16) LEA C.H. and HANNAN R.S., *Nature*, **165**, 438. (1950).
- 17) MAILLARD L.C., *Compt. Rend.*, 154-166. (1912).
- 18) NAURON J. et BLANC B., *Bibliotheca Nutritio et Dieta.*, **7**, 69-82. (1965).
- 19) MINER C.K. and WOODFORDE J., *J. Sci. Food Agric.*, **16**, n°7, 369-372. (1965).
- 20) PATTON A.R., HILL E.G., FOREMAN E. M., *Science*, **108**, 659. (1948).
- 21) PETERSON R., ROSED. and LOEB L., *Can. J. Res.*, **27**, Sect. C., 269-273 (1949).
- 22) PETIT L., GODON B. et SHEIKH N. M., *Ann. Technol. Agr.*, **1**, 5-42. (1961).
- 23) REYNOLDS T.M., *Adv. Food Res.*, **12**, 1-52. (1963).
- 24) SHEIKH N.M., Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de Paris (1960).
- 25) STADTMAN E.R., *Adv. Food Res.*, **1**, 325-372. (1948).
- 26) TAEUFEL K., IWAXINSKY H. and HAERTEL I., *Nahrung* **5**, 242-248. (1961).
- 27) ZABRODSKIJ A.G., TIKHOMIROVA E.I., *Microb.*, **27**, 127-130. (1958).