SIK

Svenska Institutet
för Konserveringsforskning

Swedish Institute for
Food Preservation Research

Fack, S-400 21 Göteborg 16, Sweden
Telefon 031/40 01 20

Rapport

SIK-Rapport
1973 Nr 330

AUTOXYDATION DES LIPIDES

Étude de paramètres intervenant dans l'oxydation lipidique (2^{me} Partie)

R. Marcuse

AUTOXYDATION DES LIPIDES. (II)

ÉTUDE DE PARAMÈTRES INTERVENANT DANS L'OXYDATION LIPIDIQUE *

Reinhard MARCUSE

Swedish Institute for Food Preservation Research SIK (Göteborg-Suède)

RFCG 73-27

*RESUME***

Quelques-uns des paramètres intervenant dans l'oxydation des lipides et leur stabilité, particulièrement les antioxygènes, les traces de métaux en général prooxydants et la pression d'oxygène, sont étudiés dans cette 2e partie.

L'auteur s'occupe, d'abord, de l'effet des acides aminés, seuls ou en présence de métaux. Ensuite il discute celui des traces de métaux et des enzymes contenant des métaux. Enfin il examine des rapports entre la pression d'oxygène et la vitesse d'oxydation et de différents facteurs influant ces rapports : la vitesse de diffusion de l'oxygène, la température, le degré d'insaturation et la présence d'antioxygènes ou des traces de métaux.

Dans la première partie de cette revue (13), ont été passées en revue des méthodes d'analyse pour déterminer le degré d'oxydation des lipides. L'existence de telles méthodes est une condition préalable nécessaire pour pouvoir contrôler la stabilité oxydative, qui dépend de certains paramètres. La connaissance de ces paramètres et leur application permettent de protéger plus efficacement les produits lipidiques contre le rancissement.

Une possibilité pour atteindre une telle protection est l'emploi d'antioxygènes parmi lesquels on distingue les produits synthétiques et naturels ; parmi ces derniers notons les acides aminés.

2.1. Effet des acides aminés

Notre intérêt pour l'effet des acides aminés remonte à des travaux que nous avons effectués antérieurement sur le rancissement des harengs salés. A cette occasion, nous avons pu observer que la phase aqueuse de ces poissons contenait des acides aminés libres, qui, avec le tocophérol, présent à très faible concentration, forment un système protecteur contre le rancissement (14). Cette observation nous a ensuite amené à étudier de façon systématique l'effet des acides aminés sur l'autoxydation lipidique. Tous les acides aminés étudiés avaient un certain effet protecteur, qui, toutefois, était particulièrement prononcé dans le cas de l'histidine et du tryptophane (15, 16). La figure 9 montre l'effet de l'histidine et de l'alanine sur l'oxydation dans une émulsion d'acide linoléique — avec et sans addition de phosphate. Les résultats, exprimés en valeurs relatives par rapport à la référence, sont représentés en fonction de la concentration de l'acide aminé ; on s'aperçoit ainsi que l'addition de phosphate renforce l'effet antioxygène et, qu'à haute concentration de l'acide aminé, l'effet peut être inverse, c'est-à-dire prooxydant.

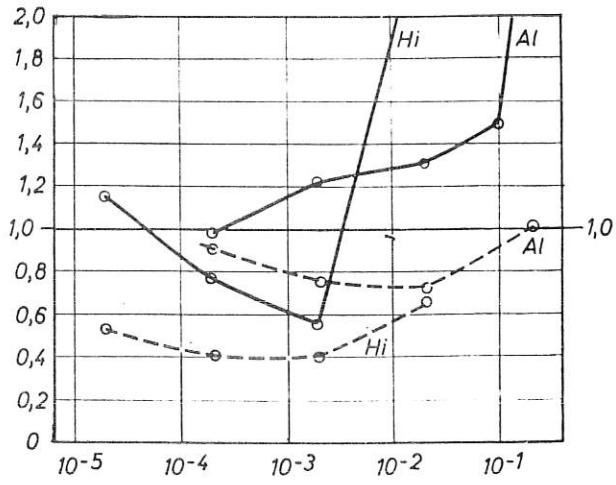

Figure 9

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la concentration (M) d'alanine ou d'histidine (relative à la vitesse dans la référence sans telle addition) sans (——) et avec addition (- - -) de phosphate (0. 1 M) 0.04 M linoléate, 40° C, pH 7,5

* 2e partie de la conférence prononcée au cours de la Journée Chevreul, Paris, 22 Novembre 1972. La 1re partie est parue dans le n° de Mai 1973.

** Summary p. 429, Zusammenfassung s. 430, Resumen p. 430.

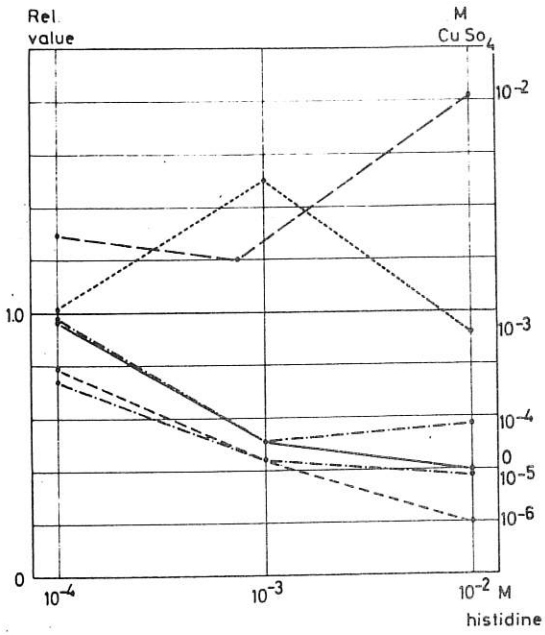

Figure 10a

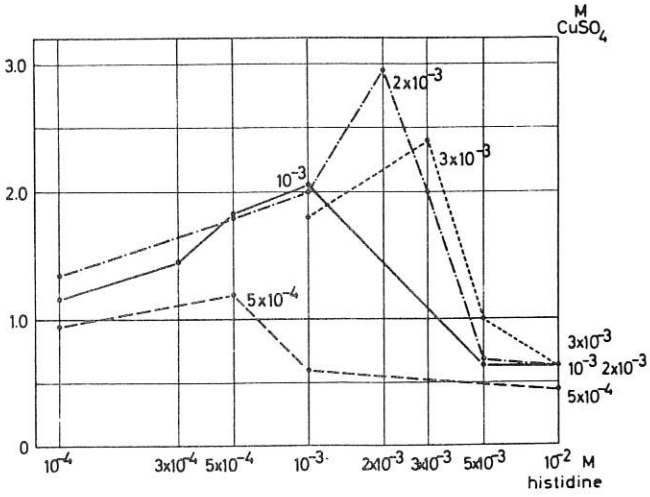

Figure 10b

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la concentration (M) d'histidine (relative à la vitesse dans la référence sans histidine) en présence de concentrations variées de Cu^{2+}. Emulsion de 0,1 M acide linoléique, pH 8.

2.1.1. *Effet combiné d'acides aminés et de métaux*

Au début nous avons considéré cet effet des acides aminés comme un effet synergique dépendant de la présence d'antioxygènes de type dit primaire. Plus tard, nous nous sommes aperçus que l'action antioxygène des acides aminés se manifestait aussi en l'absence de tels antioxygènes d'ordre primaire. Il semble qu'il y ait une relation entre cet effet et la teneur en métaux. On peut supposer que les métaux prooxydants, en réagissant avec des acides aminés, peuvent être « neutralisés ». Toutefois, il semble que, en outre, ils peuvent aussi former des complexes qui, à leur tour, sont en mesure d'exercer une action soit prooxydante, soit antioxydante.

Ceci a été constaté, par exemple, pour le cuivre et le cobalt d'une part, et l'histidine d'autre part (17, 18). La figure 10 a montre l'effet d'une addition d'histidine sur l'oxydation dans une émulsion d'acide linoléique en présence de cuivre. Les résultats sont donnés en valeurs de la consommation d'oxygène relative à la référence sans addition d'histidine. A basse concentration de Cu, l'effet antioxydant de l'histidine est renforcé ; par contre, à haute concentration, l'effet peut être inversé, c'est-à-dire qu'il peut devenir prooxydant. D'autres résultats ont montré qu'en combinant des concentrations équimoléculaires d'acide aminé et de Cu, on obtient un effet prooxydant maximum (fig. 10 b).

En faisant des expériences similaires avec du Co au lieu du Cu, nous avons également pu constater qu'en présence de très faibles quantités de Co, l'effet antioxygène de l'histidine était renforcé. Toutefois, dans ce cas l'effet n'est pas inversé à concentration plus haute. Au contraire : A une concentration de 10^{-1}M, un arrêt complet de la réaction peut avoir lieu (figure 11).

Un comportement fort similaire du cuivre et du cobalt dans une situation bien différente a été décrit dans la littérature (19). Il s'agissait d'expériences en vue de déterminer l'influence de ces métaux sur l'effet de la catalase en présence d'acides aminés. Cet effet était renforcé par l'addition d'acides aminés en présence de Cu, mais retardé ou inhibé en présence de Co.

2.2. Oxydation des lipides catalysée par des métaux

,Parmi d'autres éléments de réflexion, ces observations sur le comportement de certains métaux catalyseurs ont éveillé notre intérêt pour l'autoxydation lipidique catalysée par les métaux ; ceci a, par la

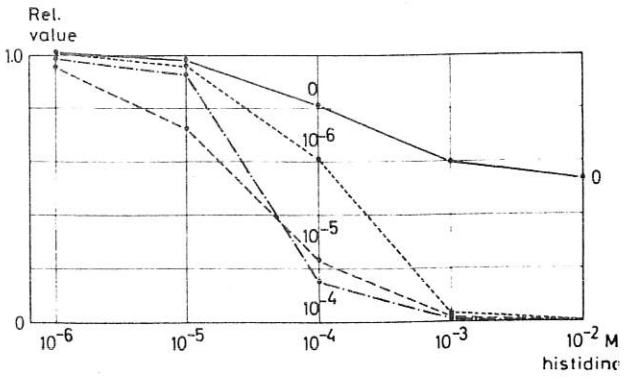

Figure 11

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la concentration (M) d'histidine (relative à la vitesse dans la référence sans histidine) en présence de concentrations variées de Co^{2+} Emulsion de 0.1 M acide linoléique ; pH 6

suite, engendré l'organisation de quelques symposia sur ce thème spécial : le premier a été organisé à Göteborg en Octobre 1967 (20), le second à Chicago en Septembre 1970 (21) et le troisième le sera à Paris en Septembre 1973.

C'est un domaine à la fois très intéressant et très important dans lequel beaucoup de nouvelles connaissances ont été acquises pendant les dernières années. Toutefois, les lacunes à combler sont toujours importantes.

En ce qui concerne la partie théorique, la question la plus importante devrait être celle des rapports entre structure chimique et activité catalytique. On devrait surtout en savoir plus sur ce qui détermine l'activité catalytique des chélates. La formation de chélates peut conduire à des effets très inattendus. Nous avons, par exemple, observé dans nos expériences avec les harengs salés que l'addition d'EDTA, bien connu pour sa propriété complexante, au lieu d'avoir un effet protecteur pouvait entraîner une accélération du rancissement.

Du point de vue pratique, l'oxydation des lipides catalysée par des métaux est d'une importance considérable pour quelques industries alimentaires, particulièrement les industries des corps gras, de la viande et du lait.

2.2.1. *Effet des enzymes contenant des métaux*

L'importance de l'action catalytique des métaux pour le problème de l'oxydation des lipides peut être illustrée par une expérience récemment décrite par Eriksson de notre institut (SIK) : Certains enzymes contenant des métaux, quand ils sont exposés au chauffage, perdent leur activité enzymatique mais en même temps deviennent des catalyseurs puissants de l'autoxydation (22).

La figure 12 montre l'influence d'un chauffage sur

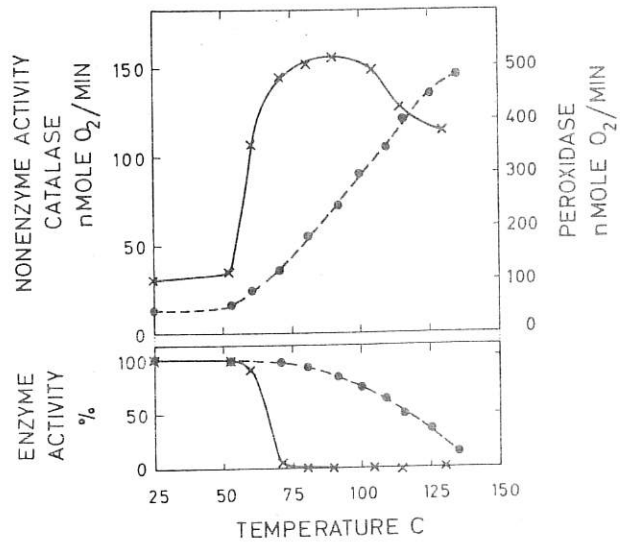

Figure 12

Activité non enzymatique et enzymatique de la catalase x——x et de la peroxydase ● - - - - ● après avoir été gardées pendant 2 heures à la température indiquée Emulsion d'acide linoléique en phosphate pH 6,5, 25° C

l'effet de la catalase et de la peroxydase : Après un certain chauffage, l'effet enzymatique diminue. En même temps, un effet catalytique apparaît, puis augmente au fur et à mesure que l'activité enzymatique diminue. On suppose que les métaux, au départ bien protégés dans la molécule, se trouvent exposés par suite de la destruction thermique de la structure moléculaire et ainsi capables d'exercer une action catalytique.

2.3. Dépendance de la pression d'oxygène

Une autre possibilité pour parvenir à la protection contre l'autoxydation qui nous a intéressé, c'est « l'élimination » de l'oxygène, ou plutôt, la diminution de la pression partielle de l'oxygène.

Ce procédé présente, néanmoins, quelques difficultés d'ordre technique et une question de coût : en effet, on n'arrive jamais à une élimination totale de l'oxygène et il n'est pas facile de réduire les faibles quantités qui restent après une baisse de la pression d'oxygène obtenue par évaporation ou passage d'un gaz inerte.

C'est un problème particulièrement important pour l'emballage des produits déshydratés spécialement des produits lyophilisés qui présentent une grande surface spécifique. C'est pourquoi le Département de l'Agriculture à Washington nous a chargé, il y a quelques années, d'un projet de recherches sur la relation entre la pression d'oxygène et la vitesse d'autoxydation ainsi que sur les paramètres qui l'influencent. Ces travaux ont été effectués à l'aide de notre appareil de Warburg modifié décrit. dans la première partie (13). Nos recherches ont été faites surtout avec des émulsions d'acide linoléique et leurs lyophilisats, ainsi que d'autres substrats tels que d'autres acides gras et leurs esters (23).

2.3.1 *Influence de la vitesse de diffusion de l'oxygène*

Les résultats montrent que l'influence de la pression d'oxygène sur la vitesse d'oxydation dépend surtout des propriétés physiques du système qui influencent la vitesse de diffusion de l'oxygène dans le substrat. Cela est montré sur la fig. 13 ; elle est la plus prononcée dans le cas d'une huile en vrac, moins pour des émulsions et encore moins pour des substrats lyophilisés. La figure montre la vitesse relative de l'oxydation (relative à celle à l'air) en fonction de la pression d'oxygène exprimée par le pourcentage de l'oxygène (pression atmosphérique). 1 % O_2 correspond, donc, à une pression d'environ 7,6 mm Hg. On voit que, dans le cas des substrats lyophilisés, la pression de l'oxygène doit être réduite extrêmement pour obtenir une réduction considérable de la vitesse de l'oxydation, ce qui peut être réalisé à l'aide d'un catalyseur au Pd et d'une atmosphère composée d'un mélange H_2/N_2.

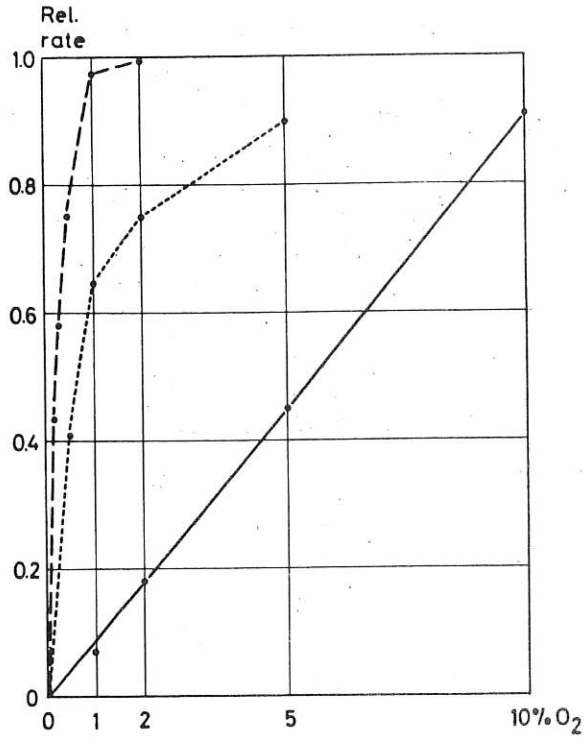

Figure 13

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la pression d'oxygène (exprimée comme pourcentage à pression atmosphérique)
Acide linoléique
a) en vrac (●——●)
b) émulsion (● - - - - - ●)
c) « émulsion » lyophilisée (●— —●)

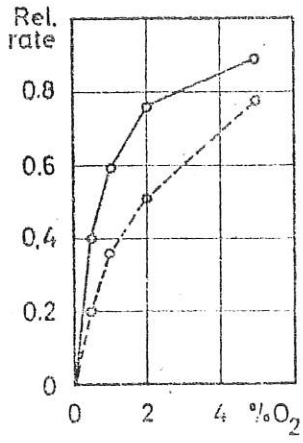

Figure 14

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la pression d'oxygène (exprimée comme pourcentage à pression atmosphérique)
à 25° C (o——o)
et à 40°C (o- - - -o)
Emulsion d'acide linoléique, pH 6

2.3.2. *Influence de la température et du degré d'insaturation*

En outre, certains facteurs tels que la température et le degré d'instauration peuvent influencer la relation entre la pression d'oxygène et la vitesse d'oxydation (23). Cependant, ces paramètres n'ont en fait qu'une importance secondaire par rapport à la disponibilité de l'oxygène ainsi que nous l'avons vu précédemment.

L'influence de la température (fig. 14) peut être expliquée par les deux réactions importantes faisant partie du mécanisme en chaîne, qui ont des énergies d'activation différentes.

		Energie d'activation
I.	$R^* + O_2 \rightarrow ROO^*$	4-5 kcal/mole
II.	$ROO^* + RH \rightarrow ROOH + R^*$	8-14 kcal/mole

Seulement une de ces réactions, celle de l'énergie d'activation plus basse, exige la présence d'oxygène. Ce fait influence la dépendance de la pression de l'oxygène : une température plus élevée favorise la réaction à l'énergie d'activation plus élevée qui n'a pas besoin d'oxygène. En conséquence, celle qui en dépend devient plus déterminante et la dépendance de la pression d'oxygène plus prononcée. L'influence du degré d'insaturation, c'est-à-dire la dépendance plus étroite dans le cas d'un degré d'insaturation plus grand, peut être expliquée d'une manière similaire.

2.3.3. *Représentation de la vitesse d'oxydation en fonction de la pression d'oxygène*

En raison de l'influence de la diffusion de l'oxygène, la relation entre la pression d'oxygène et la vitesse de l'oxydation est compliquée. Toutefois, en éliminant l'influence de cette diffusion on peut arriver à une relation assez simple ; c'est pourquoi nous avons basé la représentation (fig. 15) sur la consommation d'oxygène pendant les premières heures des expériences. En portant sur un graphique les inverses de la pression d'oxygène et de la vitesse de réaction précédemment décrits par, entre autres, Karel (24), on obtient des droites ; une inclinaison plus grande indique une dépendance de la pression d'oxygène plus prononcée. Dans la figure, cela est démontré pour le cas d'une température plus haute ou d'un substrat plus insaturé, l'acide linolénique.

Nous avons également étudié l'influence d'autres facteurs sur la relation « pression d'oxygène/vitesse d'oxydation », particulièrement celle des antioxygènes et des prooxydants. Les résultats de ces recherches peuvent être résumés de la façon suivante :

2.3.4. *Influence de la présence d'antioxygène*

La relation entre la vitesse d'oxydation et la pression d'oxygène n'est pas influencée par la présence d'antioxygènes phénoliques (25). La fig. 16 montre qu'en présence de tocophérol, la relation est la même que pour la référence.

R. MARCUSE

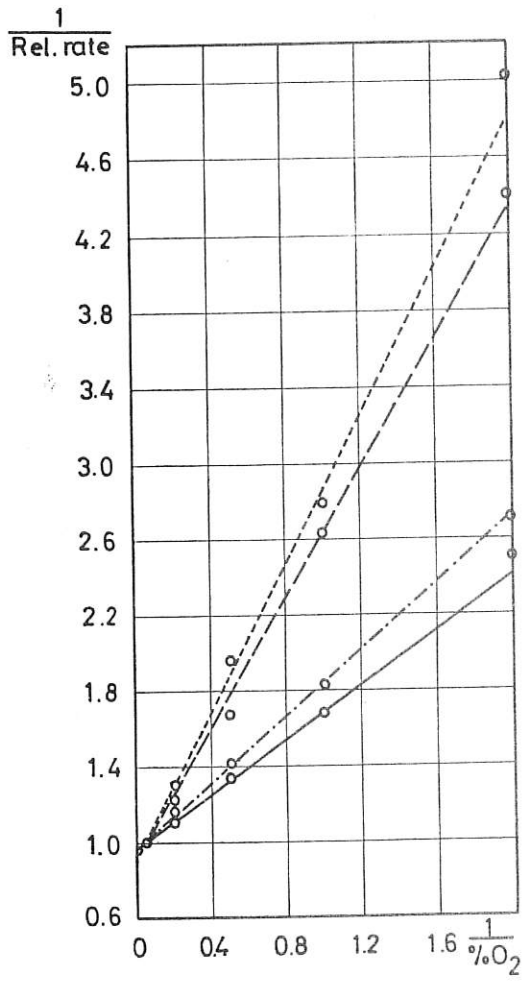

Figure 15

Vitesse relative (valeurs inverses) de la consommation d'oxygène, en fonction de la pression d'oxygène (exprimée comme pourcentage à pression atmosphérique, valeurs inverses)

Emulsions (pH 6)

o ———— o **acide linoléique, 25°C**

o— · — · —o **ester étylique de l'acide linolénique, 25°C**

o — — — o **acide linolénique, 25°C**

o - - - - - - - - o **acide linoléique, 40°C**

Par contre, la présence de certains acides aminés modifie cette relation (25). Dans ce cas une diminution de la pression d'oxygène a un effet plus grand que dans le système de référence. La fig. 17 montre le rapport entre la vitesse d'oxydation et la pression d'oxygène pour la référence et pour les cas d'une addition d'histidine ou de tocophérol et histidine. La combinaison des deux types d'antioxygènes a un effet synergique qui est aussi plus accentué à basse pression d'oxygène. Il semble que le comportement différent du tocophérol, qui n'influence pas la relation étudiée, et de l'histidine qui l'influence, soit en rapport avec le fait que le tocophérol est un antioxygène inhibiteur et l'histidine un antioxygène retardateur. (Un inhibiteur inhibe l'oxydation pour une certaine période de temps, appelée induction, un retardateur la retarde dès le début en diminuant la vitesse).

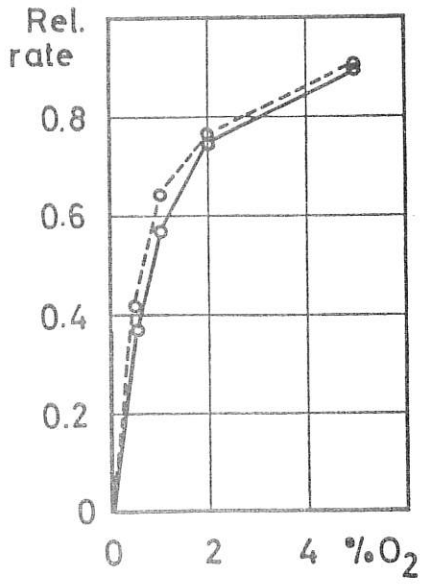

Figure 16

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la pression d'oxygène (exprimée comme pourcentage à pression atmosphérique)

Emulsion d'acide linoléique

sans (o- - - -o)

et avec (o———o) **addition de α-tocophérol (0,005 %)**

pH 6

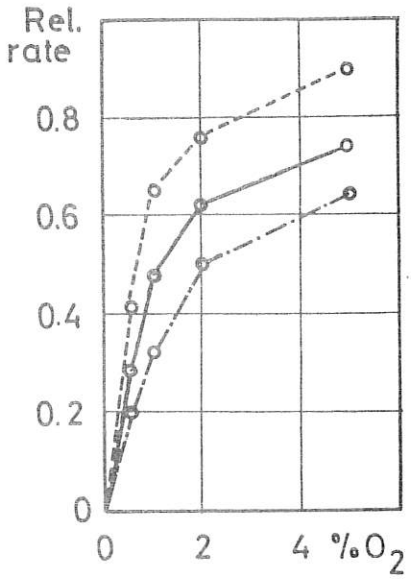

Figure 17

Vitesse relative de la consommation d'oxygène en fonction de la pression d'oxygène (exprimée comme pourcentage à pression atmosphérique)

Emulsion d'acide linoléique (o- - - -o),

avec addition d'histidine (0,01 M) (o———o)

et avec addition de tocophérol (0,005 %)

et d'histidine (0,01 M) (o—.—.—o), **pH 6**

2.3.5. *Influence de la présence de métaux*

Quant à l'influence des métaux, on a pu constater que certains présentent un phénomène d'inversion : à basse concentration, l'effet est prooxydant ; quand la concentration augmente, l'effet prooxydant passe par un maximum, puis décroît jusqu'à même devenir antioxydant. Ce phénomène est plus prononcé à basse pression d'oxygène (26) : c'est ainsi qu'une certaine concentration de Cu peut être prooxydante dans l'air, mais antioxydante à une basse pression d'oxygène, par exemple une pression correspondant à 1 % d'oxygène. Cela est montré dans la fig. 18.

Cet effet retardateur des métaux, renforcé à basse pression d'oxygène, a été observé pour le Cu^{2+} et le F^{3+}, mais pas pour le Co^{2+} et le Fe^{2+}. Il semble donc que le métal doit être dans son état de valence supérieure pour pouvoir démontrer cet effet. Selon Ingold (27), de tels métaux en état de valence supérieure peuvent entrer en concurrence avec l'oxygène et de cette manière terminer la réaction d'oxydation. Il est évident qu'un tel effet est favorisé à basse pression d'oxygène.

Les résultats de nos recherches ont ainsi montré que le rapport entre la vitesse d'oxydation et la pression d'oxygène est influencé par plusieurs facteurs ; il peut, par conséquent, être difficile de prédéterminer avec précision la stabilité d'un corps gras à une certaine pression d'oxygène ou de calculer la pression d'oxygène nécessaire pour garantir une certaine stabilité dans des conditions données.

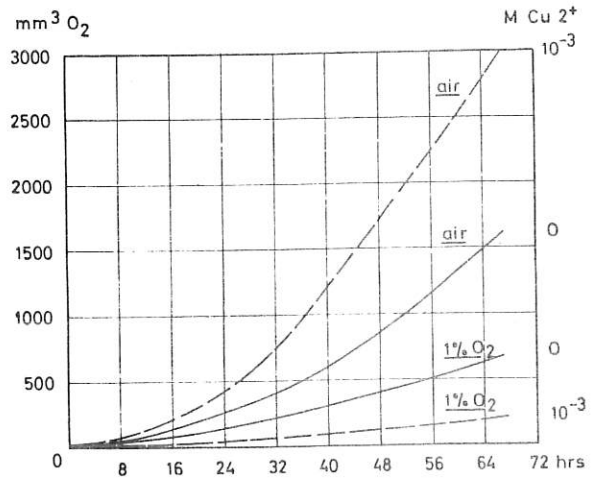

Figure 18

Consommation d'oxygène à l'air et en présence de 1 % d'oxygène à pression atmosphérique, sans (———) et avec (- - - -) addition de $CuSO_4$ (10^{-3}M) Emulsion d'acide linoléique, pH 5

2.3.6. *Application pour prédéterminer la stabilité d'un produit*

Néanmoins, il semble possible d'obtenir des résultats satisfaisants avec de tels calculs dans des conditions pratiques. Un exemple a été publié par Simons et al. (28). Sur la base de résultats d'expériences sur des systèmes-modèles, ces auteurs ont prédéterminé la stabilité de crevettes lyophilisées conservées à basse pression d'oxygène dans des emballages plastiques. La qualité de ces crevettes dépend en grande partie de la stabilité oxydative de leurs lipides. Les résultats expérimentaux concordent plus ou moins avec les prédictions calculées.

⁂

J'ai essayé de donner un aperçu sur quelques problèmes dans le domaine de l'autoxydation des lipides, problèmes concernant les méthodes d'analyse et les paramètres de l'autoxydation. En présentant des résultats de nos propres travaux, j'ai voulu illustrer ces problèmes et des possibilités de solution.

Naturellement nous ne sommes pas les seuls à nous intéresser à ces questions. Cela est un domaine important dont on s'occupe dans de nombreux laboratoires et dans lequel on a pu faire des progrès considérables dans les dernières années ce qui s'est manifesté, par exemple au cours du symposium « Lipid Oxidation Analysis », organisé à Göteborg en juin 1972 (29).

⁂

BIBLIOGRAPHIE

(13) R. Marcuse, Revue Française des Corps Gras 20 (6), 277-83 (1973).

(14) E. Jannesson et R. Marcuse, Rivista Olii Minerali, Grassi, Saponi 34 (1957) : 1, 10-14.

(15) R. Marcuse, Fette, Seifen, Anstrichm. 63 (1961), 940-944.

(16) R. Marcuse, J. Am. Oil Chem. Soc. 39 (1962) 97-103.

(17) R. Marcuse, Proceedings, 4th Scand. Symp. on Fats and Oils, Åbo (1965), 147-158.

(18) R. Marcuse, Proceedings, SIK-Symposium Metal Catalyzed Lipid Oxidation, Göteborg (1967), SIK rapport n° 240, 129-134.

(19) H. Mix, W. Langenbeck et al. Chem. Berichte 89 (1956), 69-72.

(20) R. Marcuse, Metal Catalyzed Lipid Oxidation, Proceedings, SIK-Symposium 1967, SIK-Rapport (1968), nr 240, 292 p.

(21) R. Marcuse, Metal Catalyzed Lipid Oxidation (Introduction), J. Am. Oil Chem. Soc. 48 (1971), 425-426.

(22) C.E. Eriksson, P.A. Olsson et S.G. Svensson, J. Am. Oil Chem. Soc. 48 (1971), 442-447.

(23) R. Marcuse et P.O. Fredriksson, J. Am. Oil Chen. Soc. 45 (1968), 400-407.

(24) M. Karel, Thèse, MIT, Boston (1960), 224 p.

(25) R. Marcuse et P.O. Fredriksson, J. Am. Oil Chem. Soc. 46 (1969), 262-268.

(26) R. Marcuse et P.O. Fredriksson, J. Am. Oil Chem. Soc. 48 (1971), 448-451.

(27) K.U. Ingold, Proceedings, SIK-Sympossium Metal Catalyzed Lipid Oxidation (1967), SIK rapport n° 240, 11-41.

(28) I.B. Simons, T.P. Labuza et M. Karel, J. Food Sci. 36 (1971), 280-286.

(29) A. Seher et R. Marcuse, Fette, Seifen, Anstrichm. 75 (1973), 267-268.

R. MARCUSE