

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

T H E S E

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés - Agronomie - Environnement

LES COMPOSÉS D'ARÔME LIBRES ET LIÉS DE LA MANGUE :  
STRUCTURE, EFFETS DES TRAITEMENTS

par

**Mama SAKHO**

*Maître-Assistante à l'ESP de DAKAR*

*Docteur de 3<sup>e</sup> cycle*

Soutenue le 10 Décembre 1997 devant le Jury composé de :

|               |   |                    |
|---------------|---|--------------------|
| M. BAUMES R.  | Directeur de Recherche, IPV-INRA, Montpellier | Président          |
| M. AMBID C.   | Professeur, ENSAT, Toulouse                   | Rapporteur         |
| M. RICHARD H. | Professeur, ENSIA, Massy                      | Rapporteur         |
| M. CROUZET J. | Professeur, Université Montpellier II         | Directeur de thèse |

*A la mémoire de ma mère,  
et de mon père.*

*A Cheikh Sidya,*

*A Pape Boubacar,*

*pour leur compréhension,  
leur soutien constant et  
surtout leur patience durant  
toute la réalisation de ce  
travail.*

*A mes frères et sœurs,  
pour leurs encouragements.*

*A tous les miens.*

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génie Biologique et Sciences des Aliments, Unité de Microbiologie et Biochimie Industrielles à l'Université Montpellier 2, sous la responsabilité de Monsieur le Professeur Jean Couzet, à qui je tiens à exprimer toute ma reconnaissance, mon profond et respectueux attachement, pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée, la disponibilité et l'intérêt qu'il a manifestés au cours de ce travail.*

*Je remercie vivement Monsieur Raymond Baumes, Directeur de Recherche à l'IPV-INRA, d'avoir bien voulu présider le jury de cette thèse.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Christian Ambid de l'ENSA Toulouse ainsi qu'à Monsieur le Professeur Hubert Richard de l'ENSIAM Massy, pour s'être intéressés à ce travail et avoir accepté de le juger en tant que rapporteurs.*

*Toute ma reconnaissance à Monsieur Jean-Paul Lepoutre de l'IPV-INRA pour sa disponibilité durant l'analyse par Spectrométrie de Masse.*

*A Chantal Malzac, pour sa contribution dévouée à la dactylographie de ce mémoire,*

*A Régine Grasmick et Hélène Fabre pour la grande qualité de leur travail,*

*A Christian Péréto et Marie-Pierre Panéro,*

*A tous ceux qui ont participé efficacement à la réalisation de cet ouvrage, qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements vont à toutes les personnes de l'Unité de Microbiologie et Biochimie Industrielles pour leur gentillesse et leur sympathique collaboration, particulièrement Pascale Chalier et Laurence Belloy, je garderai d'elles le meilleur souvenir.*

# **INTRODUCTION** **1**

## **CHAPITRE I**

|            |   |          |
|------------|---|----------|
| <b>I</b>   | <b>LES CONSTITUANTS VOLATILS DE LA MANGUE</b> | <b>4</b> |
| <b>I-1</b> | <b>Travaux antérieurs</b>                     | <b>4</b> |
| <b>I-2</b> | <b>Etudes des composés volatils de mangue</b> | <b>6</b> |

## **CHAPITRE II**

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| <b>II</b>         | <b>LES PRÉCURSEURS D'ARÔME DE LA MANGUE</b>  | <b>7</b>  |
| <b>II-1</b>       | <b>Les précurseurs d'arôme des végétaux</b>  | <b>7</b>  |
| <b>II-1-1</b>     | <b>La partie aglycone</b>  | <b>8</b>  |
| <b>II-1-2</b>     | <b>La partie glucidique</b>  | <b>8</b>  |
| <b>II-1-3</b>     | <b>Analyse des hétérosides après hydrolyse</b>   | <b>9</b>  |
| <b>II-1-4</b>     | <b>Analyse directe des glycosides</b>  | <b>11</b> |
| <b>II-2</b>       | <b>Les hétérosides précurseurs d'arôme de mangue</b>                                   | <b>11</b> |
| <b>II-2-1</b>     | <b>Etude de la partie glucidique</b>   | <b>12</b> |
| <b>II-2-1-1</b>   | <b>Composition en oses</b>   | <b>12</b> |
| <b>II-2-1-1-1</b> | <b>Analyse en CCM</b>  | <b>12</b> |
| <b>II-2-1-1-2</b> | <b>Détermination des oses après hydrolyse acide en CPG</b>                             | <b>12</b> |
| <b>II-2-1-1-3</b> | <b>Détermination des oses après transformation en acétate d'alditol</b>                | <b>13</b> |
| <b>II-2-1-2</b>   | <b>Etude structurale des glycosides par perméthylation</b>                             | <b>13</b> |
| <b>II-2-2</b>     | <b>Etude de la partie aglycone</b>   | <b>16</b> |
| <b>II-2-3</b>     | <b>Analyse directe des glycosides par couplage CPG-SM</b>                              | <b>19</b> |
| <b>II-2-3-1</b>   | <b>Dérivation des hétérosides</b>  | <b>19</b> |
| <b>II-2-3-2</b>   | <b>Spectrométrie de masse en impact électronique des dérivés TFA</b>                   | <b>21</b> |
| <b>II-2-3-3</b>   | <b>Spectrométrie de masse en ionisation chimique (en mode négatif) des dérivés TFA</b> | <b>21</b> |
| <b>II-2-3-4</b>   | <b>Identification des hétérosides dérivés TFA</b>                                      | <b>22</b> |

## **CHAPITRE III**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III INFLUENCE DES TRAITEMENTS SUR LES COMPOSÉS<br/>VOLATILS DE LA MANGUE</b> | <b>27</b> |
| <b>III-1 Généralités</b>  | <b>27</b> |
| <b>III-2 Effet du chauffage sur les composés volatils de la mangue</b>          | <b>29</b> |
| <b>III-3 La macération</b>  | <b>30</b> |
| <b>III-3-1 La paroi cellulaire</b>  | <b>30</b> |
| <b>III-3-2 Les substances pectiques</b>   | <b>31</b> |
| <b>III-3-3 Les enzymes</b>  | <b>32</b> |
| <b>III-3-4 Application de la macération à la pulpe de mangue</b>                | <b>33</b> |
| <br>  |           |
| <b>CONCLUSION</b>   | <b>37</b> |
| <br>  |           |
| <b>ANNEXES</b>  | <b>40</b> |
| <br>  |           |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>  | <b>54</b> |
| <br>  |           |
| <b>LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b>                                       | <b>72</b> |

# АВАНТ - ПРОПОС

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes

**Articles :**

SAKHO M., CROUZET J., SECK S., 1985. Volatile components of african mango. *J. Food Sci.* , **50**, 548-550.

SAKHO M., CROUZET J., SECK S., 1985. Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **18**, 89-93.

KOULIBALY A., SAKHO M., CROUZET J., 1992. Variability of free and bound volatile terpenic compounds in mango. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **25**, 374-379.

SAKHO M., CHASSAGNE D., CROUZET J., 1997. African mango glycosidically bound volatile compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 883-888.

SAKHO M., CHASSAGNE D., JAUS A., CHIARAZZO E., CROUZET J.. Enzymatic maceration of mango pulp, effect on the volatile components. (Soumis à *J. Food Sci.*).

**Chapitres d'ouvrages :**

CROUZET J., SAKHO M. et CHASSAGNE D., 1996. Fruit aroma precursors with special references to phenolics. In: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. (Eds.) Thomas-Barberan P., Robins R.J., Phytochemical Society, Londres, pp. 109-123.

CROUZET J., CHASSAGNE D. et SAKHO M., 1996. Contribution of glycosidically bound volatile compounds to processes food aroma. In: *The Importance of Non- and Low Volatile Materials to the Flavour of Food*. (Eds.) Pichenhagen W., Ho C.T., Allured Publishing Company, Carol Stream, U.S.A., pp. 207-216.

## ABREVIATIONS

### Techniques analytiques

|        |  |
|--------|--|
| CCM    | Chromatographie sur Couche Mince                                     |
| CPG    | Chromatographie en Phase Gazeuse                                     |
| CPG-SM | Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse |
| IE     | Impact Electronique  |
| IC     | Ionisation Chimique  |
| ICN    | Ionisation Chimique en mode Négatif                                  |
| RMN    | Résonance Magnétique Nucléaire                                       |

### Composés

|                 |   |
|-----------------|---|
| Araf-Glcp       | $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside              |
| BSTFA + 1% TMCS | N-O-bis-Triméthylsilyl-trifluoroacétamide + 1 % Triméthylchlorosilane |
| Glcp            | $\beta$ -D-Glucopyranoside  |
| MBTFA           | N-Méthyl-Bis-Trifluoroacétamide                                       |
| Rhap-Glcp       | $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside               |

### Divers

|            |  |
|------------|--|
| d.i.       | diamètre interne   |
| DM         | Degré de Méthylation   |
| EI         | Etalon Interne   |
| FL         | Fraction Liée  |
| FM         | Faiblement Méthylé   |
| HM         | Hautement Méthylé  |
| IR         | Indice de Rétention  |
| L          | Longueur   |
| <i>m/z</i> | masse sur charge   |
| SDE        | Simultaneous Distillation Extraction (Extraction Distillation Simultanées) |
| TFA        | Trifluoroacétylé   |
| TFAO       | Groupement Trifluoroacétate  |
| TMS        | Triméthylsilylé  |
| TRR        | Temps de Rétention Relatif   |

# INTRODUCTION

## Introduction

La mangue, deuxième rang des fruits tropicaux après la banane, occupe une place de plus en plus importante dans la consommation des fruits. Sa production augmente régulièrement. Elle est passée de 10 millions de tonnes à 19 millions de tonnes par an en dix ans (Anonyme 1996).

La sélection de variétés tardives, améliorées et greffées prolonge la période de production.

L'Asie représente à elle seule presque 80 % de la production mondiale (Loeillet, 1994), suivie des pays d'Amérique 13 % et de l'Afrique 7 %. L'Inde est de loin le premier pays producteur avec plus de 50 % de la production mondiale (Tableau 1).

Selon Loeillet (1996) les principaux importateurs de mangues à l'état frais sont les USA et l'Union Européenne. Dans cette dernière, le Royaume Uni vient en tête des importations suivi par la France et l'Allemagne.

Malgré sa première place en production, l'Inde se retrouve en deuxième position des pays exportateurs de fruits frais derrière le Mexique (Tableau 2). Mais il faut noter que l'Inde exporte également des produits transformés dans sa sous-région asiatique ainsi qu'au Royaume Uni, des produits dérivés de la pulpe de mangue verte d'une part (chutneys, pickles, tranches de mangue verte immergées dans la saumure et aromatisées par divers condiments) (de Laroussilhe, 1980). D'autre part la mangue mûre est transformée en nectar (Sahni et Khurdiya, 1989), en flocons, en poudre de mangue (Ammu et *al.*, 1976), en tablettes de fruits (Mathur et *al.*, 1972) en fruits au sirop et beaucoup d'autres produits.

Le manguiier est une dicotylédone, appartenant à la famille des *Anacardiaceae*, il compte plus de mille variétés. La plupart des variétés cultivées sont issues de quatre espèces principales: *Mangifera sylvatica*, *Mangifera indica*, *Mangifera odorata* et *Mangifera zeylanica* (Subramanyam et *al.*, 1975).

Originaire de la péninsule indo-birmane, le manguiier existe depuis plus de 4000 ans, les variétés cultivées résultent de la sélection constante par l'homme de la plante sauvage. Le manguiier pousse dans les régions chaudes tropicales et subtropicales. Certaines variétés se sont adaptées à l'agroclimat d'une région et ne peuvent être cultivées ailleurs.

**Tableau 1 : production<sup>a</sup> mondiale de mangues.**

|             | Rappel 89/91 | 1993                | 1994                | 1995                |
|-------------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Inde        | 8 441        | 10 000 <sup>b</sup> | 10 000 <sup>b</sup> | 10 000 <sup>b</sup> |
| Mexique     | 1 101        | 1 151               | 1 118               | 1 362               |
| Chine       | 770          | 1 117 <sup>b</sup>  | 1 141 <sup>b</sup>  | 1 141 <sup>b</sup>  |
| Pakistan    | 759          | 794                 | 839                 | 884                 |
| Indonésie   | 531          | 750 <sup>b</sup>    | 780 <sup>b</sup>    | 780 <sup>b</sup>    |
| Thaïlande   | 599          | 660 <sup>b</sup>    | 650 <sup>b</sup>    | 650 <sup>b</sup>    |
| Nigéria     | 496          | 500 <sup>b</sup>    | 500 <sup>b</sup>    | 500 <sup>b</sup>    |
| Brésil      | 390          | 400 <sup>b</sup>    | 400 <sup>b</sup>    | 400 <sup>b</sup>    |
| Philippines | 338          | 336                 | 366                 | 390 <sup>b</sup>    |
| Zaïre       | 209          | 212 <sup>b</sup>    | 212 <sup>b</sup>    | 212 <sup>b</sup>    |
| Haïti       | 310          | 230 <sup>b</sup>    | 230 <sup>b</sup>    | 230 <sup>b</sup>    |
| Madagascar  | 203          | 205 <sup>b</sup>    | 200 <sup>b</sup>    | 200 <sup>b</sup>    |
| Autres      | 1 982        | 2 139 <sup>b</sup>  | 2 300 <sup>b</sup>  | 2 254 <sup>b</sup>  |
| TOTAL       | 16 129       | 18 494              | 18 736              | 19 033 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>Milliers de tonnes pour les pays produisant plus de 200 milliers de tonnes/an (d'après Anonyme , 1996).

<sup>b</sup>Estimation.

**Tableau 2 : principaux pays producteurs-exportateurs de mangues (fruits frais)<sup>a</sup>.**

| Pays producteurs       | Production en<br>millier de tonnes | Exportation       |     | Destinations principales                 |
|------------------------|------------------------------------|-------------------|-----|--|
|                        |                                    | millier de tonnes | %   |  |
| Inde (2) <sup>b</sup>  | 9 500                              | 12                | 0,1 | Emirats Arabes Unis - Arabie<br>Saoudite |
| Mexique (2)            | 800                                | 60                | 7,5 | USA - Union Européenne<br>Canada         |
| Pakistan (1)           | 761                                | 11                | 1,4 | Pays du Golfe Persique                   |
| Philippines (2)        | 375                                | 10                | 2,7 | Asie                                     |
| Thaïlande (1)          | 400                                | 7                 | 1,8 | Malaisie - Hong Kong                     |
| Brésil (2)             | 415                                | 6                 | 1,4 | Union Européenne                         |
| Afrique de l'Ouest (2) | 40                                 | 3                 | 7,5 | Union Européenne                         |

<sup>a</sup>D'après Loeillet, 1991 : (1) : production année 1988,

(2) : production année 1990.

<sup>b</sup> estimation.

Le fruit, la mangue, est une drupe ovoïde (Fig 1), charnue suivant les variétés et à pulpe plus ou moins fibreuse, de forme dissymétrique, de grosseur et de poids variables. Elle est diversement colorée (jaune, rouge, vert, rouge-jaune, vert-jaune...).

Comme tous les produits tropicaux, la mangue est sensible aux basses températures qui retardent beaucoup la maturation et entraînent des perturbations biochimiques importantes. La durée du stockage et la nature de l'atmosphère ont également une influence sur la maturation. Ainsi, Hatton et Reeder (1966) ont conservé à 13°C, sous cinq atmosphères de compositions différentes, la variété Keitt. A l'issue de leur expérience ils constatent qu'une température de 21°C et une atmosphère contrôlée de 5 % d'oxygène, 5 % de gaz carbonique et 90 % d'azote permettent d'avoir des mangues de couleur et d'arôme typiques.

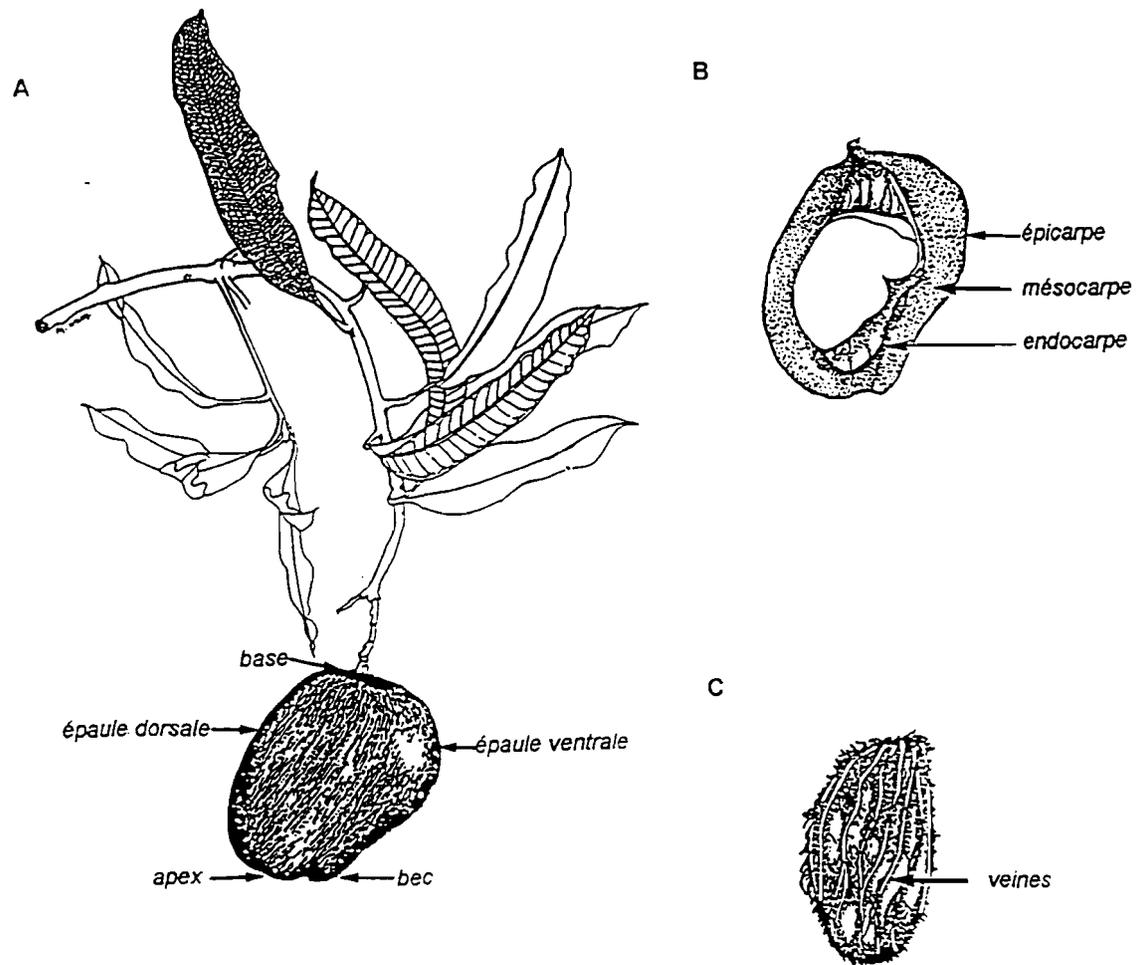
En raison de sa grande fragilité et des normes de qualités imposées par les pays importateurs, son exportation à l'état frais est insignifiante par rapport à sa production. Alors que la mangue, comme la plupart des fruits tropicaux est très appréciée en pâtisserie, confiserie, en industrie laitière (yoghourt,...) pour la préparation de glace, sorbet, cocktail, de jus de fruits,...

Son arôme particulier est caractérisé par l'ensemble des substances volatiles directement accessibles par la muqueuse olfactive. Il en existe également d'autres non volatiles, les précurseurs qui sont un potentiel d'arômes susceptibles d'être transformés en constituants odorants participant à l'arôme.

L'objet du présent travail est l'étude des composés volatils et de leur précurseurs chez une mangue non greffée cultivée au Sénégal et des modifications qui peuvent intervenir au cours des processus de transformation. Dans cette optique, nous avons étudié l'effet du chauffage et de l'hydrolyse enzymatique (macération) sur les composés volatils de la mangue.

Dans un premier chapitre nous aborderons l'étude des composés volatils libres qui a fait l'objet de deux publications :

- Volatile components of african mango - Sakho M., Crouzet J. et Seck S. - 1985a - J. Food Sci., **50**, 548-550 ;
- Variability of free and bound volatile terpenic compounds in mango - Koulibaly A., Sakho M. and Crouzet J. - 1992 - Lebensm. Wiss. u. Technol., **25**, 374-379.



**Figure 1 : Mangue fruit sur pousse (A) , fruit en coupe (B) , noyau (C )**  
 ( Purseglove, 1974 )

Le second chapitre traite des hétérosides précurseurs d'arôme de la mangue qui a fait également l'objet de publication :

- African mango glycosidically bound volatile compounds - Sakho M., Chassagne D. and Crouzet J. - 1997 - J. Agric. Food Chem., **45**, 883-888.

Le troisième chapitre est consacré à l'effet des traitements sur les composés d'arôme de la mangue.

L'effet de la température est développé dans la publication :

- Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage - Sakho M., Crouzet J. et Seck S. - 1985b - Lebensm. Wiss. u. Technol., **18**, 89-93.

Enfin, l'étude de la macération enzymatique de la pulpe de mangue et l'effet de ce traitement sur les composés volatils a fait l'objet d'une publication soumise à J. Food Sci. :

- Enzymatic maceration of mango pulp, effect on the volatile components. Sakho M., Chassagne D., Jaus A., Chiarazzo E., Crouzet J.

# CHAPITRE I

# I Les constituants volatils de la mangue

## I-1 Travaux antérieurs

Les premières études sur les substances volatiles de la mangue ont été réalisées il y a une vingtaine d'années, alors que beaucoup de travaux ont été effectués sur la production, la préservation, le stockage.

Des analyses préliminaires ont été entreprises par Pattabhiraman *et al.* (1969) qui ont mis en évidence des esters et des composés carbonylés dans la variété « Alphonso ». Plus tard Angelini *et al.* (1973) étudient les composés d'arôme de mangue. En 1974, une étape importante fut franchie grâce au couplage CPG-SM lorsque Hunter *et al.* (1974) ont pu identifier 41 composés volatils de la pulpe de mangue en conserve de la variété « Alphonso ». Après de nombreux travaux ont été entrepris dans ce domaine : Diaz (1976) ; Abdel-Baki *et al.* (1981), Macleod et Gonzalez de Troconis (1982), Yamaguchi *et al.* (1983), Engel et Tressl (1983a), Mac Leod et Pieris (1984), Mac Leod et Snyder (1985), Sakho *et al.* (1985a), Wilson *et al.* (1986), Bartley et Schwede (1987), Mac Leod *et al.* (1988), Mac Leod et Snyder (1988), Pino *et al.* (1989).

De nos jours plus de 150 composés volatils de mangue ont été identifiés appartenant à différentes classes chimiques : hydrocarbure, ester, alcool, lactone, acide, aldéhyde, cétone. Il est intéressant de souligner que les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques prédominent et contribuent, sans doute favorablement, à l'arôme de mangue comme l'ont indiqué certains auteurs : Mac Leod et Gonzalez de Troconis (1982), Mac Leod et Pieris (1984), Engel et Tressl (1983a), Wilson *et al.* (1986). Tout récemment, Ollé *et al.* (1997) ont montré que lors d'un procédé de microfiltration de la pulpe de mangue, le rétentat où sont isolés tous les hydrocarbures terpéniques possède un arôme comparable à celui de la pulpe de départ, contrairement au perméat où ces auteurs n'avaient détecté aucun hydrocarbure.

Malgré les divers travaux réalisés, les chercheurs n'ont pas pu déterminer un constituant responsable de l'arôme de mangue, comme l'eugénol dans le clou de girofle, la vanilline dans la vanille, l'acétate d'isopentyle dans la banane, ou un mélange de composés y répondant. Cependant il a été constaté que l'arôme dépendait de la variété.

Ainsi, Engel et Tressl (1983a) démontrent une très grande différence qualitative et quantitative des substances volatiles entre deux variétés de mangue « Alphonso » et « Baladi » provenant d'Égypte ; Wilson et *al.* (1986) répertorient les différences selon les variétés et les origines. Quant à Koulibaly et *al.* (1992) après l'étude de six variétés de mangue cultivées dans la région ouest africaine « Muskat », « mango », « Papaye », « Gouverneur », « Amélie » et « Pêche », ils relèvent des différences importantes entre ces variétés. Ils remarquent que la variété « mango » est la plus riche en composés volatils et présente une analogie sur le plan qualitatif avec la variété « Gouverneur ». Par ailleurs, le myrcène, le caryophyllène et l' $\alpha$ -humulène sont des composés majeurs, communs aux six variétés mais des différences s'observent au niveau des autres constituants.

Toujours selon Koulibaly et *al.* (1992), les variétés « mango » et « Gouverneur » se distinguent en plus par des pics majoritaires correspondant aux limonène,  $\alpha$ -terpinolène et  $\alpha$ -phellandène, tandis que pour les variétés « Amélie » et « Muskat » l' $\alpha$ -terpinène et l'ocimène prédominent, quant à la variété « Papaye » c'est l' $\alpha$ -copaène.

Selon Gholap et Bandyopadhyay (1980), Mac Leod et de Troconis (1982), Engel et Tressl (1983a), les lactones et acides gras joueraient un rôle important dans l'arôme de mangue. Les esters et autres dérivés carbonylés présents en quantités variables, seraient responsables de la note fruitée (Mac Leod et de Troconis, 1982 ; Engel et Tressl, 1983a ; Mac Leod et Snyder, 1985 ; Wilson et *al.* 1986).

Mac Leod et Pieris (1984) attribuent même la note mangue au décanoate d'éthyle. Les alcools à chaînes courtes, particulièrement les alcools en C6, les terpénols et les alcools aromatiques (alcool benzylique, 2-phényléthanol) contribueraient également à l'arôme de mangue, de même que les composés norisoprénoïdes. Ainsi la complexité des substances intervenant dans l'arôme de mangue permet difficilement d'établir un arôme typique ou une formulation d'arôme, dans la mesure où il y a autant d'arômes que de variétés.

Certains auteurs pensent que non seulement les différences d'arôme sont liées à la variété mais également à la zone géographique. A ce propos, Mac Leod et Snyder (1985) remarquent que les variétés de mangue d'origine indienne sont caractérisées par la présence de cis-ocimène, myrcène ou limonène comme composés majeurs tandis que celles d'origine américaine (Vénézuéla et Floride, variétés Tommy et Keitt) et aussi africaine, possèdent le car-3-ène comme monoterpène majeur. Cependant, le car-3-ène a été identifié dans deux variétés Srilankaises (Willard et Parrot) mais pas dans Alphonso et Baladi, variétés indiennes. Ce qui ne simplifie pas la mise au point d'arôme type, car l'arôme résulte en général de la contribution de

peu ou de plusieurs substances volatiles, chacune d'elles étant responsable d'une note typique comme par exemple dans la banane : le mélange d'élimicine, d'eugenol, de méthoxy eugenol et d'éther de méthyl eugényle contribuent à l'arôme du fruit mûr (Nursten, 1970). De même dans le fruit de la passion Casimir et *al.* (1981) ont sélectionné 15 constituants comme étant responsables de l'arôme spécifique. Il faut noter que les substances volatiles qui concourent de façon significative à l'arôme interviennent à des teneurs très différentes. En effet, des composés présents en faibles quantités peuvent se révéler être des constituants majeurs pour l'arôme, alors que d'autres avec une concentration élevée joueraient un rôle négligeable.

## **I-2 Etudes des composés volatils de mangue**

Des études sur les composés volatils de la mangue, variété mango produite au Sénégal à Sébikhotane, ont été réalisées. Après extraction des constituants volatils par différentes méthodes, par évaporation sous vide, piégeage sur polymère Tenax GC et par fractionnement sur gel de silice, de nouveaux composés ont été identifiés (Publication n°1 : Sakho M., Crouzet J. and Seck S. 1985a. Volatile Components of African Mango. *J. Food Sci.*, **50**, 548-550).

Sur la base de ces données et afin de préciser les différences d'arôme variétales, six variétés de mango ont été étudiées : « mango », « Gouverneur », « Pêche », « Papaye », « Muscat » et « Amélie ». Les constituants volatils sont isolés par distillation simultanée (SDE) et piégeage sur charbon graphite suivi de désorption par microondes.

Les résultats indiquent des différences quantitatives pour les composés terpéniques et sesquiterpéniques entre la variété mango plus riche (6 mg/kg) et les autres, notamment la variété pêche (1 mg/kg). De même, des différences qualitatives sont constatées : des composés tels que car-3-ène,  $\alpha$ -phellandrène,  $\alpha$ -muurolène entre autres, sont absents dans certaines variétés (« Papaye », « Muscat » et « Amélie ») (Publication n°2 : Koulibaly A., Sakho M. and Crouzet J. 1992. Variability of Free and Bound Volatile Terpenic Compounds in Mango. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, **25**, 374-379).

Ces résultats qui confirment les travaux antérieurs sur les différences d'arôme variétales, en l'occurrence ceux de Engel et Tressl (1983a) sur la variété Alphonso et Baladi.

Les composés d'arôme caractérisés par le fait qu'il s'agit de substances volatiles libres directement accessibles par la muqueuse olfactive, peuvent exister chez les végétaux également sous forme liée non volatile, connues sous le nom de précurseurs d'arôme.

## A Research Note Volatile Components of African Mango

M. SAKHO, J. CROUZET, and S. SECK

### ABSTRACT

Volatile components of African mango were isolated by vacuum distillation and fractionation on silica gel or by trapping on Tenax GC. Analysis by combined GC-MS led to several compounds identified for the first time. Presence in the extract of isolongifolene, eremophilene (17%), and components related to bicyclogermacrene showed the variability of the volatile fraction of mango varieties. Some of these compounds, as well as  $\Delta_3$  carene, may be typical of local varieties. The African mango studied is also characterized by presence of free acids: acetic (0.7%), butyric (6%), and hexanoic (5%); and ethyl 3-hydroxybutyrate (5%). These compounds are part of the contribution of lipid metabolism to aroma of mango fruit.

### INTRODUCTION

NUMEROUS STUDIES on the volatile components of tropical fruits have appeared in recent years because of their attractive flavor for consumers. Among these fruits, the flavor of mango (*Mangifera indica* L.), the second most important tropical fruit after bananas, has been extensively investigated (Angelini et al., 1973; Hunter et al., 1974; Gholap and Bandyopadhyay, 1975, 1977; Diaz, 1980; Abd El Baki et al., 1981; Mac Leod and de Troconis, 1982; Idstein and Schreier, 1983; Engel and Tressl, 1983). The results obtained by most of these authors show that considerable differences occur between varieties grown in the same country to the same stage of ripeness. Most of the works reported to date have been undertaken using mango cultivated in India, Egypt or South and Central America; No study concerning African mango has appeared in the literature. The present work was undertaken to investigate the flavor components of mango, and the differences in composition between varieties.

### MATERIALS & METHODS

#### Mangos

Mango fruits used in this study were obtained from ungrafted trees growing at Pout and Sebikhotane, Senegal. Ninety kilograms of fruits in the full ripe stage were washed, crushed and refined (screen 1 mm in diameter) using a pilot pulper-refiner-pitter. The puree thus obtained (59 kg) was homogenized, poured in polyethylene bags without any heat treatment and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use (5 - 6 months). All these operations were performed in the pilot plant of Institut de Technologie Alimentaire de Dakar.

#### Sampling techniques

Adsorption on Tenax GC. The trapping technique described by Jennings et al. (1972) was used.

Vacuum steam distillation. The volatile components were obtained by stripping according to Siesso and Crouzet (1977).

#### Silica gel fractionation

The mango extract was fractionated by the method of Palmer (1973) into four fractions (I to IV).

*Authors Sakho and Crouzet are affiliated with the Centre de Genie et Technologie Alimentaire, Laboratoire de Biochimie Appliquee, Universite des Sciences et Techniques du Languedoc F 34060, Montpellier, France. Author Seck is affiliated with Ecole Nationale Supérieure Universitaire de Technologie, BP 5085, Dakar, Senegal.*

#### Analytical gas chromatography

A Varian Aerograph 2400 gas chromatograph fitted with FID and a 60 m x 0.5 mm glass capillary column coated with Carbowax 20 M was used. The temperature was held at  $70^{\circ}\text{C}$  for 10 min, then programmed at  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $180^{\circ}\text{C}$ . The carrier gas was nitrogen at 7 mL/min. The output signal was fed through a Spectra Physics SP 4000 Central processor and plotted on a SP 4050 printer plotter. Authentic samples of chemicals used for identification purpose based on retention determination were obtained from commercial supply houses or were received as gifts. Muhuhu and Copahu essential oils were used for identification of some sesquiterpenic hydrocarbons. Kovats index given by Jennings and Shibamoto (1980) were used.

#### Gas chromatography-Mass spectrometry

An LKB 2091 mass spectrometer was coupled with the glass capillary column used for analytical gas chromatography and operated under the conditions previously indicated. The ionizing voltage was 70 eV and source temperature  $230^{\circ}\text{C}$ .

### RESULTS & DISCUSSION

THE COMPOUNDS IDENTIFIED in the African mango concentrate obtained by vacuum steam distillation are listed in Table 1. Some of them - camphene, ethyl styrene, isolongifolene,  $\alpha$ -bergamotene, aromadendrene,  $\alpha$ - and  $\delta$ -guaiene, eremophilene, alloaromadendrene,  $\alpha$ -muurolene, butyric and hexanoic acids, benzyl and furfuryl alcohols, 2-acetyl pyrrole and dihydroactinidiolide - are reported for the first time as mango volatile components.

Particular attention must be paid to terpenic and sesquiterpenic hydrocarbons. As stated by several authors (Mac Leod and Gonzalez de Troconis, 1982; Engel and Tressl, 1983) these compounds were quantitatively the most important (about 40% of the sample); furthermore, the volatiles trapped on Tenax GC (Table 2) were essentially compounds with a terpenic skeleton. As the mixture obtained after desorption of the porous polymer had an aroma reminiscent of mango we can assume that these compounds are important contributors to this aroma.  $\Delta_3$  Carene, previously isolated from Venezuelan mango fruit (Mac Leod and Gonzalez de Troconis 1982) and described by these authors as having an aroma of mango leaves, was also present in the concentrate obtained from the African mango under study. More recently Gholap and Bandyopadhyay (1984) found that two compounds tentatively identified as car-3-ene and cis-ocimene contributed to the mango odor of the rhizome of *Curcuma amada* Roxb. Both extracts, obtained after vacuum distillation and adsorption on Tenax GC, were characterized by presence of considerable quantities (17% and 30%, respectively), of a sesquiterpenic hydrocarbon identified as eremophilene. Although we are not in possession of an authentic sample of this product its mass spectrum matched that of the spectrum of the authentic product published elsewhere (Stenhagen et al., 1974). This compound, isolated from Valerian oil (Witek and Krepinsky, 1966) or from rhizomes of plants of genus *Petasites* (Hochmannova et al. 1962), has not been described previously as a fruit volatile component. Isolongifolene was present in the two extracts obtained by vacuum distillation and adsorption on Tenax GC and is also

Table 1—Identification of volatile components isolated from African mango

| Peak N <sup>o</sup> | Component                           | Fraction | Kovats index <sup>a</sup> | Relative abundance % | Evidence <sup>c</sup> |
|---------------------|-------------------------------------|----------|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| 1                   | ethyl butanoate                     | II       | 1025                      | 0,2                  | MS,RT                 |
| 2                   | $\alpha$ -pinene                    | I        | 1039                      | 0,1                  | MS,RT                 |
| 3                   | Toluene                             | I        | 1055                      | 0,9                  | MS,RT                 |
| 4                   | Camphene <sup>b</sup>               | I        | 1083                      | 0,2                  | MS,RT                 |
| 5                   | hexanal                             | II       | 1084                      | tr                   | MS,RT                 |
| 6                   | $\beta$ -pinene                     | I        | 1124                      | 0,1                  | MS,RT                 |
| 7                   | myrcene                             | I        | 1156                      | 1,2                  | MS,RT                 |
| 8                   | $\Delta_3$ -carene                  | I        | 1165                      | 3,6                  | MS,RT                 |
| 9                   | $\alpha$ -phellandrene              | I        | 1177                      | 0,1                  | MS,RT                 |
| 10                  | limonene                            | I        | 1206                      | 1,6                  | MS,RT                 |
| 11                  | $\beta$ -phellandrene               | I        | 1216                      | 0,2                  | MS                    |
| 12                  | cis-ocimene                         | I        | 1228                      | 0,3                  | MS,RT                 |
| 13                  | $\gamma$ -terpinene                 | I        | 1251                      | 0,3                  | MS,RT                 |
| 14                  | ethyl-styrene <sup>b</sup>          |          |                           | tr                   | MS                    |
| 15                  | p-cymene                            | I        | 1272                      | 3,5                  | MS,RT                 |
| 16                  | allicimene                          | I        |                           | 0,2                  | MS                    |
| 17                  | acetoine                            | III      | 1276                      | 0,1                  | MS,RT                 |
| 18                  | dimethylstyrene                     | IV       |                           | trace                | MS                    |
| 19                  | terpinolene                         | I        | 1287                      | 1,5                  | MS                    |
| 29                  | hexanol                             | III      | 1316                      | 2,0                  | MS,RT                 |
| 21                  | (Z)-3-hexene-1-ol                   | III      | 1351                      | 1,5                  | MS,RT                 |
| 22                  | (E)-2-hexene-1-ol                   | III      | 1368                      | 0,2                  | MS,RT                 |
| 23                  | acetic acid                         | III      | 1419                      | 0,7                  | MS,RT                 |
| 24                  | butyl hexanoate                     | II       | 1402                      | 0,3                  | MS                    |
| 25                  | ethyl octanoate + cis-linalooloxide | II       | 1423                      | 0,8                  | MS,RT                 |
| 26                  | furfural                            |          | 1449                      | 0,2                  | MS,RT                 |
| 27                  | trans-linalool oxide                | II       | 1451                      | tr                   | MS,RT                 |
| 28                  | 2-acetyl furan                      |          | 1491                      | 0,1                  | MS,RT                 |
| 29                  | benzaldehyde                        | II       | 1502                      | tr                   | MS,RT                 |
| 30                  | linalool                            | III      | 1506                      | 1,0                  | MS,RT                 |
| 31                  | unknown                             |          |                           | 1,5                  |                       |
| 32                  | isolongifolene <sup>b</sup>         | I        |                           | 1,2                  | MS,RT                 |
| 33                  | $\alpha$ -copaene                   | I        | 1519                      | 0,9                  | MS,RT                 |
| 34                  | 5-methyl furfural                   |          | 1563                      | 0,6                  | MS,RT                 |

Table 1 continued

|    |                                    |     |      |       |       |
|----|------------------------------------|-----|------|-------|-------|
| 35 | ethyl 3-hydroxybutanoate           | II  |      | 5,2   | MS    |
| 36 | $\alpha$ -bergamotene <sup>b</sup> | I   |      | 1,4   | MS,RT |
| 37 | $\alpha$ -gurjunene                | I   |      | 1,5   | MS    |
| 38 | butyric acid <sup>b</sup>          | III |      | 6,1   | MS,RT |
| 39 | $\beta$ -caryophyllene             | I   | 1618 | 0,2   | MS,RT |
| 40 | aromadendrene <sup>b</sup>         | I   | —    | 0,2   | MS,RT |
| 41 | ethyl decanoate                    | II  | 1624 | 0,1   | MS,RT |
| 42 | $\alpha$ -guaiene <sup>b</sup>     | I   | 1629 | 0,1   | MS    |
| 43 | acetophenone                       |     | 1627 | trace | MS,RT |
| 44 | $\gamma$ -butyrolactone            | III | 1632 | 0,6   | MS,RT |
| 45 | furfuryl alcohol <sup>b</sup>      |     |      | 0,6   | MS,RT |
| 46 | $\alpha$ -humulene                 | I   | 1632 | 2,6   | MS    |
| 47 | aromatic component                 |     |      | 0,8   | MS    |
| 48 | $\alpha$ -terpineol                | III | 1661 | 0,4   | MS,RT |
| 49 | sesquiterpene                      |     |      | 0,5   |       |
| 50 | eremophilene <sup>b</sup>          | I   |      | 17,5  | MS    |
| 51 | alloaromadendrene <sup>b</sup>     | I   | 1662 | 1,6   | MS,RT |
| 52 | $\delta$ -guaiene <sup>b</sup>     | I   |      | 0,5   | MS    |
| 53 | sesquiterpene                      | I   |      | 0,5   | MS    |
| 54 | geranial                           | II  | 1730 | 0,7   | MS,RT |
| 55 | $\gamma$ -hexalactone              | IV  |      | 1,1   | MS,RT |
| 56 | $\alpha$ -muurolene <sup>b</sup>   | I   | 1730 | 1,1   | MS,RT |
| 57 | $\delta$ -cadinene                 | I   | 1761 | 0,8   | MS,RT |
| 58 | $\gamma$ -cadinene                 | I   | 1766 | 0,3   | MS,RT |
| 59 | benzyl alcohol <sup>b</sup>        | II  | 1822 | 0,1   | MS,RT |
| 60 | damascenone                        |     |      | 0,1   | MS,RT |
| 61 | hexanoic acid <sup>b</sup>         | IV  |      | 5,1   | MS,RT |
| 62 | ethyl dodecanoate                  | II  | 1826 | 3,0   | MS,RT |
| 63 | 2-phenyl ethanol                   | III | 1855 | 0,7   | MS,RT |
| 64 | $\gamma$ -octalactone              | IV  | 1883 | 2,7   | MS,RT |
| 65 | $\beta$ -ionone                    |     | 1918 | 0,6   | MS,RT |
| 66 | 2-acetyl pyrrole <sup>b</sup>      |     | 1935 | 0,2   | MS,RT |
| 67 | $\gamma$ -nonalactone              | IV  | 1991 | 3,0   | MS,RT |
| 68 | ethyl tetradecanoate               | II  | 2027 | 0,3   | MS,RT |
| 69 | $\gamma$ -decalactone              | IV  | 2101 | 0,4   | MS,RT |
| 70 | $\delta$ -decalactone              | IV  | 2144 | 0,6   | MS,RT |
| 71 | dihydroactinidiolide <sup>b</sup>  |     | 2324 | trace | MS,RT |
| 72 | ethyl hexadecanoate                | II  | —    | 0,6   | MS,RT |

<sup>a</sup> Jennings and Shibamoto (1980).

<sup>b</sup> Identified for the first time in mango volatile components.

<sup>c</sup> MS mass spectrum; RT = retention time.

identified for the first time in mango volatile components, and more generally, in fruit aroma components. However, this compound may be an artefact formed from longifolene (Ramdas Nayak and Dev, 1960). The presence of these three compounds, as well as the identification of  $\alpha$ - and  $\delta$ -guaiene and  $\alpha$ -muurolene in some mango varieties, illustrates the variability underlined by several authors.

Among the African mango volatile components we found aromadendrene and alloaromadendrene besides  $\alpha$ -gurjunene, previously identified by Engel and Tressl (1983) in variety Baladi. According to Tressl et al. (1983) these tricyclic sesquiterpenes may arise from bicyclogermacrene and are possible precursors of sesquiterpenic alcohols: ledol, veridiflorol . . . through epoxides.

The presence of ledol (Diaz, 1980) and of bicyclogermacrene, globulol and viridiflorol stated by Engel and Tressl (1983) makes this sequence possible in mango fruit.

MacLeod and Gonzalez de Troconis (1983) pointed out the presence of a dimethyl styrene among the volatile components of mango and presumed that this compound contributed to fresh mango fruit flavor. A dimethyl styrene and one isomer, ethyl styrene were identified on the basis of their mass spectra (Stenhagen et al., 1974). Though  $\alpha$ -p dimethyl styrene is known to arise from citral by cyclisation (Kimura et al., 1983) no increase in the concentration of styrene derivatives occurred during heat treatment of mango juice (Sakho et al., 1984). Thus we can assume that the two styrenes found are really present in mango fruit.

Organic acids found in the present work may be present in the fruit or originate from the hydrolysis of esters during

Table 2—Volatile components of African mango identified after trapping on Tenax GC

| Peak no. | Component           | Peak no. | Component              |
|----------|---------------------|----------|------------------------|
| 1        | $\alpha$ -pinene    | 11       | ethyl octanoate        |
| 2        | toluene             | 12       | isolongifolene         |
| 3        | camphene            | 13       | $\alpha$ -copaene      |
| 4        | hexanal             | 14       | $\alpha$ -bergamotene  |
| 5        | $\beta$ -pinene     | 15       | $\alpha$ -gurjunene    |
| 6        | $\Delta_3$ -carene  | 16       | $\beta$ -caryophyllene |
| 7        | limonene            | 17       | eremophilene           |
| 8        | $\gamma$ -terpinene | 18       | alloaromadendrene      |
| 9        | p-cymene            | 19       | $\alpha$ -muurolene    |
| 10       | allicimene          |          |                        |

crushing or extraction step. The presence in our extract of some esters previously identified in mango (ethyl esters of fatty acids, ethyl butanoate, butyl hexanoate and ethyl-3-hydroxybutanoate) shows that hydrolysis does not occur during sample preparation. Ethyl-3-hydroxybutanoate (ca. 5% of the extract) may be considered as a characteristic compound of the variety studied, as well as of the variety Baladi. Conversely, it is less important in variety Alphonso (Engel and Tressl 1983). The presence of acids, esters, and also lactones agrees with previous works concerning the contribution of lipid metabolism in the development of the

## VOLATILE COMPONENTS OF AFRICAN MANGO . . .

roma and flavor of mango fruit during ripening (Bandyopadhyay and Gholap, 1973; Gholap and Bandyopadhyay, 1980).

C<sub>6</sub> aldehydes and alcohols previously detected in variety Alphonso were also present in aroma extract from African mango. However, these compounds formed during crushing of most of the fruits (Ericksson, 1979) are dependent on the enzymatic equipment of the fruit and conditions of crushing (Kazeniak and Hall, 1970).

Some of the compounds isolated — furan derivatives, acetyl pyrrole,  $\beta$ -ionone, damascenone, dihydroactinidiolide, linalool oxides — are clearly artefacts formed during preparation of pulp or during extraction step.

### REFERENCES

- Abd El-Baki, M.M., Askar, A., El Samahy, S.K., and Abd El-Fadeel, M.G. 1981. Studies on mango flavor. Deuts. Lebensm. Rund. 77: 139.
- Angelini, P., Bandyopadhyay, C., Rao, B.Y.K., Gholap, A.S., and Bazinet, M.L. 1973. Studies on aroma of ripe mango pulp: identification of aroma bearing compounds 33rd Annual meeting of the Institute of Food Technologists, Miami Beach, FL.
- Bandyopadhyay, C. and Gholap, A.S. 1973. Relationship of Aroma and flavour characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) to fatty acid composition. J. Sci. Food Agric. 24: 1497.
- Diaz, N. 1980. A preliminary study on the flavor and aroma components of four mango varieties. J. Agric. Univ. P.R. 64: 357.
- Engel, K.H. and Tressal, R. 1983. Studies on the volatile components of two mango varieties. J. Agric. Food Chem. 31: 796.
- Erickson, C.E. 1979. Review of biosynthesis of volatiles in fruits and vegetables since 1975 in Progress in flavour research. p. 159. Applied Sci. Publ. Ltd., London.
- Gholap, A.S. and Bandyopadhyay, C. 1980. Fatty acid biogenesis in ripening Mango (*Mangifera indica* L. var Alphonso.). J. Agric. Food Chem. 28: 839.
- Gholap, A.S. and Bandyopadhyay, C. 1984. Characterization of green aroma of Raw mango (*Mangifera indica* L.). J. Sci. Food Agric. 28: 885.
- Gholap, A.S. and Bandyopadhyay, C. 1980. Fatty acid biogenesis in ripening Mango (*Mangifera indica* L. var Alphonso.). J. Agric. Food Chem. 28: 839.
- Gholap, A.S. and Bandyopadhyay, C. 1984. Characterization of mango-like aroma in *Curcuma amada* Roxb. J. Agric. Food Chem. 32: 57.
- Hochmannova, J., Novotny, L., and Herout, V. 1962. Hydrocarbons from *Petasites albus* rhizomes; Sesquiterpenic hydrocarbons from rhizomes of *Petasites officinalis*. Collect. Czech. Chem. Commun., 27: 1711:1870.
- Hunter, G.L.K., Bucek, W.A., and Radford, T. 1974. Volatile components of canned Alphonso mango. J. Food Sci. 39: 900.
- Idstein, H. and Schreier, P. 1983. Change of volatiles during maceration and liquefaction of selected tropical fruits. Euro Food Chemistry II, Roma.
- Jennings, W.G., Wohleb, R., and Lewis, M.J. 1972. Gas chromatographic analysis of headspace volatiles of alcoholic beverages. J. Food Sci. 37: 69.
- Jennings, W.G. and Shibamoto, T. 1980. "Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatile by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York.
- Kazeniak, S.J. and Hall, R.M. 1970. Flavor chemistry of tomato volatile. J. Food Sci. 35: 519.
- Kimura, K., Nishimura, H., Iwata, I., and Mizutani, J. 1983. Deterioration mechanism of lemon flavor. 2 Formation of off-odor substances arising from citral. J. Agric. Food Chem. 31: 801.
- MacLeod, A.J. and Gonzalez de Troconis, N. 1982. Volatile flavour components of mango fruit. Phytochemistry 21: 2523.
- Palmer, J.K. 1973. Separation of components of aroma concentrates on the basis of functional group and aroma quality. J. Agric. Food Chem. 21: 923.
- Ramdas Nayak, V. and Dev, S. 1960. Sesquiterpenes: hydration of longifolene Tetrahedron 8: 42.
- Sakho, M., Crouzet, J., and Seck, S. 1984. Changes of mango volatile components during heating. Lebensm. Wissen. Tech. (In press).
- Siesso, V. and Crouzet, J. 1977. Tomato volatile components: effects of processing. Food Chem. 2: 241.
- Stenhagen, E., Abrahamson, S., and Mac Lafferty, F.W. 1974. "Registry of Mass Spectral Data." John Wiley & Sons Inc., New York.
- Tressal, R., Engel, K.H., Kossa, M., and Köpplu, H. 1983. Characterization of tricyclic sesquiterpenes in hop (*Humulus Lupulus*, var *Hersbrucker spät*). J. Agric. Food Chem. 31: 892.
- Witek, S. and Krepinsky, J. 1966. The composition of valerian oil (*Valeriana officinalis*) Collect. Czech. Chem. Commun. 31: 1113.

Ms received 4/20/84; revised 11/28/84; accepted 11/28/84.

The authors are indebted to Mr. Garnerio, Sté Robertet, Grasse for the gift of Copahu and Muhuhu essential oils, to Mr. Doucet service de spectrométrie de Masse de la Faculté de Pharmacie de Montpellier for expert gas chromatography-mass spectrometry, and to Dr. O. Kane from the Institut de Technologie Alimentaire-Dakar for facilities in mango processing.

# Variability of Free and Bound Volatile Terpenic Compounds in Mango

A. Koulibaly, M. Sakho and J. Crouzet

J. Crouzet: Laboratoire de Génie Biologique et Sciences des Aliments, Unité de Microbiologie et Biochimie Industrielles, Université de Montpellier II, F-34095 Montpellier Cédex 05 (France)

M. Saho: Ecole Nationale Supérieure Universitaire de Technologie, BP 5085 Dakar (Sénégal)

A. Koulibaly: Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée, BP 241, Bamako (Mali)

(Received March 13, 1992; accepted May 13, 1992)

*Terpenic compounds were isolated from five grafted mango cultivars: Peach, Papaya, Muskat, Governor and Amelie and one local ungrafted mango cultivated in Sénégal using two recovery techniques; simultaneous distillation-extraction (SDE) and dynamic headspace (trapping on charcoal-graphite followed by microwave desorption). The gas chromatography results obtained by these two techniques are in agreement and show that terpene and sesquiterpene content decreases from more than 6 mg/kg for the local mango to about 1 mg/kg in Peach, Muskat and Amelie cultivars.*

*Compounds such as myrcene, caryophyllene and  $\alpha$ -humulene are present in the chromatograms of all the varieties studied whereas other terpen hydrocarbons such as  $\alpha$ -copaene and  $\gamma$ -terpinene seem to be characteristic of particular cultivars.*

*Free terpenic alcohols have been identified in minute quantities in all varieties, 1-menthol being present in every case. Besides these free compounds, glycosidically bound derivatives were detected, more particularly in the local variety and in Governor c.v. Linalool furanoxides, linalool,  $\alpha$ -terpineol, 1-menthol and benzyl alcohol have been identified after acid hydrolysis of the heterosidic pools isolated from these two varieties.*

## Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is the second most important tropical fruit after banana with a world production of 15 M tons in 1989. Many hundred of mango cultivars or local varieties are cultivated in several tropical areas such as India, Africa, Australia, Central and South America and Florida.

The works performed today point out important differences concerning the aroma compounds' content and composition, according to the nature of cultivars, maturity stage and production area for each cultivar.

The volatile compounds are present in mango fruit in concentrations varying from 60  $\mu$ g/kg to 231 mg/kg (1-5). It is generally recognized that mango aroma varies qualitatively and quantitatively according to the nature of the cultivar and that lipid metabolism is the main contributor to its development (6,7). Esters, some fatty acids and lactones are reported as important compounds in mango aroma (2,4,5,7-9). On the other hand, the results obtained by several authors (1-4,8,10) indicate that monoterpene and sesquiterpene compounds, and more particularly hydrocarbons, are the most important compounds present among volatiles. According to the varieties studied these compounds represent 60 to more than 90 percent of the isolated compounds. According to the results of these quantitative data and those of flavor, the importance of monoterpenes hydrocarbon in mango aroma was suggested (2,5). However, wide variations in the nature of the major monoterpenes and sesquiterpenes identified are generally reported.

However, the increase of the relative percent of  $\alpha$ -terpineol observed during heat treatment of mango purée (11) cannot be explained only by oxidation and rearrangement reactions of terpenic compounds. In these conditions, the hypothesis of

the presence in mango pulp of glycosidically bound terpenic compounds such as those previously identified in several fruit (12-18) was formulated.

The aim of the present work was to study terpenic compounds present in free or bound form in different cultivars and in a local variety grown in Sénégal.

## Material and Methods

Mango fruits used in the present study were cultivars Governor, Peach, Muskat, Papaya, Amelie and an ungrafted local mango variety, obtained for an orchard located near Dakar (Sénégal).

Fruits gathered at full ripe stage were washed, crushed and refined (screen 1 mm in diameter) using a pilot pulper-refiner-pitter. The puree obtained was homogenized, poured into polyethylene bags and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 weeks to 2 months. All these operations were performed in the pilot plant of the Institut de Technologie Alimentaire, Dakar (Sénégal).

### Isolation of volatile compounds

Two techniques were used for the isolation of mango volatile compounds.

(a) 100 g mango puree were mixed with 150 mL phosphate buffer, pH 7, and the volatile components were isolated by simultaneous distillation-extraction (SDE) (19) using 10 mL pentane-diethylether (1:1) for 2 h.

The solvent phase was dried on sodium sulfate and concentrated to 0.1 mL under a smooth nitrogen flow.

(b) 100 g mango puree and 150 mL phosphate buffer, pH 7, were flushed at  $60^{\circ}\text{C}$  for 2 h by a nitrogen stream, 30 mL/min.

purified through a 18' × 1/4" stainless steel column filled with Sil-O-Cell C 22 adsorbant and cooled at -70°C. The volatile components stripped by the gas flow were trapped on an activated charcoal-graphite trap (20).

#### Desorption of volatile components

After 2 h the trap was introduced in a Microwave Sampler MW 1 (20) coupled to the gas chromatograph (GC).

A nitrogen flow was forced through the trap in the reverse direction as that used for trapping for a number of seconds, in order to eliminate traces of water and to obtain a pressure equilibrium with the GC column. The microwave generator was activated for 4 s and the trapped volatile compounds were desorbed and introduced in the column.

The interface temperature was 200°C and the split flow 36 mL/min.

#### Isolation of glycosidically bound volatile compounds

300 g mango puree (ungrafted mango and Governor c.v.) were homogenized for 3 min at 5 to 10°C in a Waring-Blendor. The fruit homogenates were treated for 90 min at 25°C with 3.5 g/L Pectinol D5 S (Röhm) and 0.2 g/L cellulase (Sigma), and clear juices obtained by two successive centrifugation at 2500 g for 30 min and 50 000 g for 15 min. It was checked that in these conditions the glycosidically bound terpenes obtained by synthesis were not hydrolysed (21).

The glycosidic fraction was obtained from the clear mango juice according to the procedure described by Williams *et al.* (22) of adsorption on Polygosil 60-4063 C<sub>18</sub> reversed phase and elution by methanol. The methanolic solution was evaporated under vacuum and the residue dissolved in 5 mL distilled water.

#### Estimation of free and bound volatile compounds

The rapid analytical technique described by Latrasse (23) and Dimitriadis and Williams (24) was used for the estimation of free and potentially volatile monoterpene components present in the mango varieties. The intensity of the coloration developed by action of vanillin-sulfuric acid reagent on the steam distillates, obtained from the different mango juices before and after acid hydrolysis, was measured at 608 nm.

A standard curve was obtained using linalool and the results are expressed as mg of this compound per kg of mango pulp.

#### Acid hydrolysis of glycosidically bound compounds

The mango glycosidic fraction in water solution was extracted for 1 h by simultaneous distillation-extraction using dichloromethane as extraction solvent. After this time the solvent flask was changed and the aqueous solution acidified to pH 3 by addition of HCl 1 mol/L. The volatile components produced by hydrolysis were continuously extracted for 2 h at 100°C.

The organic phase obtained was dried on sodium sulfate, concentrated to 0.3 mL and analysed by gas chromatography.

#### Gas chromatography

A Varian 3300 gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID) and a 30 m × 0.25 mm (i.d.) silica capillary column DB5 (J and W) was used. The temperature was held at 60°C for 10 min, then programmed at 4°C/min to 250°C. The carrier was hydrogen.

Authentic samples of chemicals used for identification purpose were obtained from commercial supply houses or were received as gifts (25).

Quantitative determination were carried out by using a Shimadzu CR-3A printer-plotter, butyl hydroxy toluene (BHT) were used as internal standard. The calibration factors of the different compounds isolated were assumed to be equal to one.

#### Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

A Hewlett-Packard 5995 mass spectrometer fitted with the same column as that used for analytical gas chromatography and operated in the same conditions was used. The ionization voltage was 70 eV and the ion source temperature 150°C.

## Results and Discussion

The chromatogram obtained for Papaya and Muskat c.v. extracts obtained by SDE are given in Figs 1 and 2. The terpene and sesquiterpene hydrocarbons identified in the extracts from six mango varieties are given in Table 1. According to the results previously reported (1-4,8,10) the importance of these compounds varies quantitatively according to the variety, from only 15% of the total volatile compounds for the Amelie c.v. to about 60% for Governor c.v. The most important terpene and sesquiterpene hydrocarbons content, 6.86 mg/kg, was found for the ungrafted African

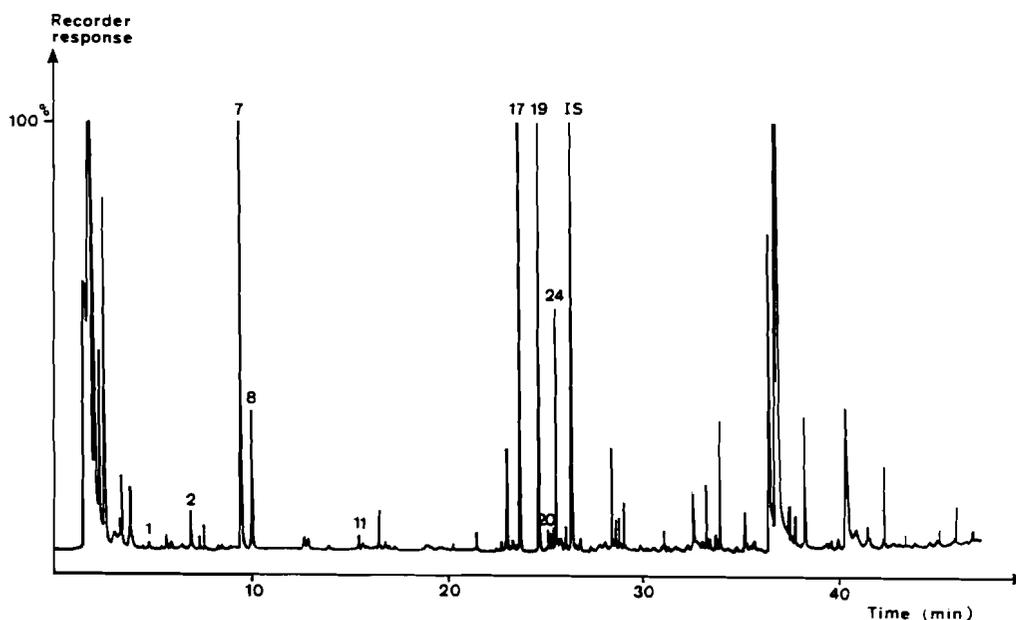


Fig. 1 Gas chromatogram of terpenic compounds isolated by simultaneous distillation-extraction. Solvent: pentane-diethyl ether (1:1, mL/L), from Muskat c.v. DB5, J and W, silica capillary column, 30 m × 0.25 mm (i.d.), operated at 60°C for 10 min and then programmed to 250°C at 4°C/min. 1,  $\alpha$ -pinene; 2, myrcene; 7,  $\gamma$ -terpinene; 8, ocimene; 11, l-menthol; 12, *cis*-linalool furanoxide; 13, *trans*-linalool furanoxide; 14, linalool; 17, caryophyllene; 19,  $\alpha$ -humulene; 20,  $\alpha$ -terpineol; 24,  $\beta$ -selinene; 15, internal standard

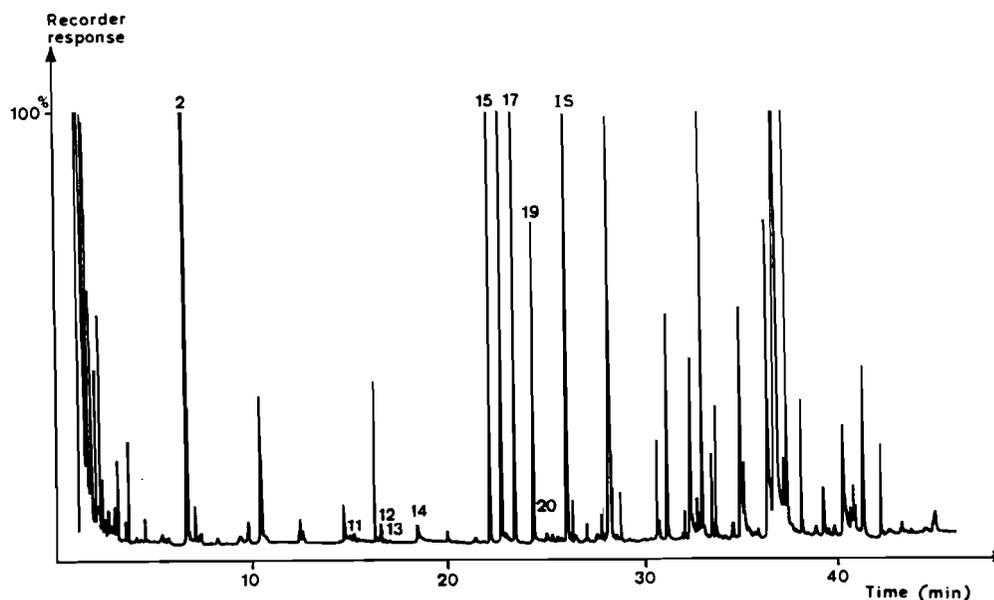


Fig. 2 Gas chromatogram of terpenic compounds isolated by simultaneous distillation-extraction. Solvent: pentane-diethyl ether (1:1, mL/L) from Papaya c.v. DB5, J and W, silica capillary column, 30 m  $\times$  0.25 mm (i.d.), operated at 60°C for 10 min and then programmed to 250°C at 4°C/min. 2. myrcene; 11. 1-menthol; 12. *cis*-linalool furanoxide; 13. *trans*-linalool furanoxide; 15.  $\alpha$ -copaene; 17. caryophyllene; 19.  $\alpha$ -humulene; 20.  $\alpha$ -terpineol; 1S. internal standard

Table 1 Terpene and sesquiterpene hydrocarbons identified in the extracts obtained by the SDE technique from several African mango varieties (results expressed in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of mango pulp)

| Compound               | Mango variety |          |       |        |        |        |
|------------------------|---------------|----------|-------|--------|--------|--------|
|                        | Mango         | Governor | Peach | Papaya | Muskat | Amélie |
| $\alpha$ -Pinene       | 500           | 350      | 5     | —      | tr     | 5      |
| Myrcene                | 800           | 40       | 350   | 1200   | tr     | 300    |
| $\Delta$ -3-Carene     | 150           | 40       | tr    | —      | —      | —      |
| $\alpha$ -Phellandrene | 500           | 350      | 100   | —      | —      | —      |
| <i>p</i> -Cymene       | 100           | 80       | —     | —      | —      | —      |
| Limonene               | 700           | 40       | 5     | —      | —      | —      |
| $\gamma$ -Terpinene    | 20            | 40       | —     | —      | 250    | 300    |
| Ocimene                | 40            | 30       | 30    | —      | 80     | —      |
| $\alpha$ -Terpinolene  | 600           | 500      | —     | —      | —      | —      |
| Allo-ocimene           | 450           | —        | tr    | —      | —      | 100    |
| $\alpha$ -Copaene      | 40            | 10       | 20    | 450    | —      | —      |
| $\alpha$ -Gurjumene    | 500           | 350      | tr    | —      | —      | —      |
| Caryophyllene          | 550           | 400      | 200   | 500    | 450    | 350    |
| Aromadendrene          | 20            | 40       | —     | —      | —      | —      |
| $\alpha$ -Humulene     | 500           | 350      | 150   | 250    | 300    | 250    |
| Alloaromadendrene      | 400           | 20       | —     | —      | —      | —      |
| $\alpha$ -Murolene     | 100           | —        | 5     | —      | —      | —      |
| $\delta$ -Cadinene     | 90            | —        | 30    | tr     | tr     | tr     |
| $\beta$ -Selinene      | 700           | 30       | —     | —      | 150    | —      |
| Unknown Sesquiterpene  | 100           | 20       | —     | —      | —      | —      |
| Total                  | 6860          | 3050     | 1075  | 2400   | 1230   | 1300   |
| Percent of total       | 49%           | 60%      | 20%   | 44%    | 47%    | 15%    |

tr. Trace.

mango: in this case these compounds represent about 50% of the total volatile compounds isolated.

The low level of terpenic compounds found in grafted varieties studied in the present work (1 to 3 mg/kg) is probably the result of breeding, the turpentine like aroma of the local varieties being less appreciated by the European consumers than by Indian or African people.

Some compounds, such as myrcene, caryophyllene and  $\alpha$ -humulene, were found in more or less equal quantities in all the varieties studied. Whereas other compounds, such as  $\alpha$ -pinene,  $\Delta$ -3-carene, *p*-cymene,  $\alpha$ -terpinolene, aromadendrene and alloaromadendrene were present in the local variety and in Governor c.v. On the other hand, some com-

pounds appear to be characteristic of certain varieties, e.g.  $\alpha$ -copaene (Papaya),  $\gamma$ -terpinene (Muskat and Amélie).

The results of the terpenic alcohols identified in the six mango varieties, using the same extraction method, are reported in Table 2.

There is good agreement with previously reported data of the presence of several terpenic alcohols in mango (3,5,25-27); the content of these components is low (50 to 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and varies according to the nature of the variety.

Besides linalool, linalool furanoxides and  $\alpha$ -terpineol, 1-menthol [previously identified by Idstein and Schreier (3) in Alfonso mango] is found in six varieties. This compound is very important (800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in the Amélie c.v.

**Table 2** Terpenic alcohols identified in the extracts obtained by the SDE technique from several African mango varieties (results expressed in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of mango pulp)

| Compound                          | Mango variety |          |       |        |        |        |
|-----------------------------------|---------------|----------|-------|--------|--------|--------|
|                                   | Mango         | Governor | Peach | Papaya | Muskat | Amélie |
| l-Menthol                         | 30            | 20       | 300   | 100    | 5      | 800    |
| <i>cis</i> -Linalool furanoxide   | 100           | 10       | tr    | tr     | 10     | tr     |
| <i>trans</i> -Linalool furanoxide | 20            | tr       | tr    | tr     | 10     | tr     |
| Linalool                          | 150           | 100      | 5     | 60     | 20     | 5      |
| $\alpha$ -Terpineol               | 50            | 10       | <5    | 50     | <5     | 5      |

tr. Trace.

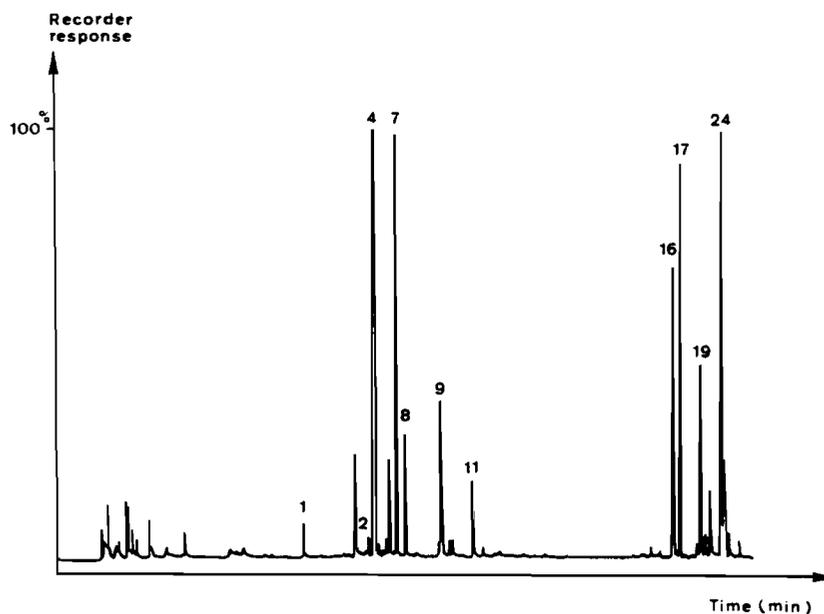
**Table 3** Terpene and sesquiterpene hydrocarbons identified in the headspace of several African mango varieties (results expressed in relative percent)

| Compound               | Mango variety |          |       |        |        |        |
|------------------------|---------------|----------|-------|--------|--------|--------|
|                        | Mango         | Governor | Peach | Papaya | Muskat | Amélie |
| $\alpha$ -Pinene       | 5             | 3        | <0.5  | <0.5   | 0.5    | —      |
| Myrcene                | 10            | 7        | 28    | 23     | 1.5    | 2      |
| $\Delta$ -3-Carene     | 2             | 0.8      | —     | —      | —      | —      |
| $\alpha$ -Phellandrene | 40            | 25       | 9     | —      | 37     | —      |
| <i>p</i> -Cymene       | 5             | 3.5      | —     | —      | —      | —      |
| Limonene               | 8             | 7        | 0.7   | —      | —      | —      |
| $\gamma$ -Terpinene    | <0.5          | —        | —     | —      | 7.5    | 32     |
| Ocimene                | <0.5          | —        | —     | 2      | 2      | 10     |
| $\alpha$ -Terpinolene  | 8             | 10       | 1     | —      | 2.5    | —      |
| l-Menthol              | 0.6           | —        | —     | —      | 1.5    | 9      |
| $\alpha$ -Copaene      | tr            | <0.5     | 2     | 5.5    | —      | —      |
| $\alpha$ -Gurjunene    | 1             | 1.2      | 1.5   | —      | 5      | 1      |
| Caryophyllene          | 0.5           | 3.5      | 6     | 8.5    | 7      | —      |
| $\alpha$ -Humulene     | <0.5          | 1.5      | 3.5   | 4      | 3.5    | 0.5    |
| $\beta$ -Selinene      | 0.5           | —        | —     | <0.5   | 8.5    | —      |

Several compounds had longer retention times than the internal standard and were identified to be long chain ( $\text{C}_{12}$  to  $\text{C}_{18}$ ) saturated and unsaturated fatty acid methyl and ethyl esters and free fatty acids; these compounds, not isolated with the headspace technique are not discussed further here.

The volatile compounds present in the juice of the six mango varieties and isolated by the dynamic headspace method, involving trapping on activated charcoal-graphite and microwave desorption, are given in Table 3. The chromatograms obtained for Papaya and Muskat c.v. are represented in Figs 3 and 4. The compounds isolated according to this method may be considered as more representative of the compounds really important in fruit aroma (28) than those recovered by steam distillation and/or solvent extraction.

As previously reported (26,28,29), the compounds isolated were terpene and to a least extent sesquiterpene hydrocar-



**Fig. 3** Gas chromatogram of terpenic compounds isolated by adsorption on activated charcoal-graphite trap and microwave desorption from Muskat c.v. DB5, J and W, silica capillary column, 30 m  $\times$  0.25 mm (i.d.), operated at 60°C for 10 min and then programmed to 250°C at 4°C/min. 1,  $\alpha$ -pinene; 2, myrcene; 4,  $\alpha$ -phellandrene; 7,  $\gamma$ -terpinene; 8, ocimene; 9,  $\alpha$ -terpinolene; 11, l-menthol; 16,  $\alpha$ -gurjunene; 17, caryophyllene; 19,  $\alpha$ -humulene; 24,  $\beta$ -selinene

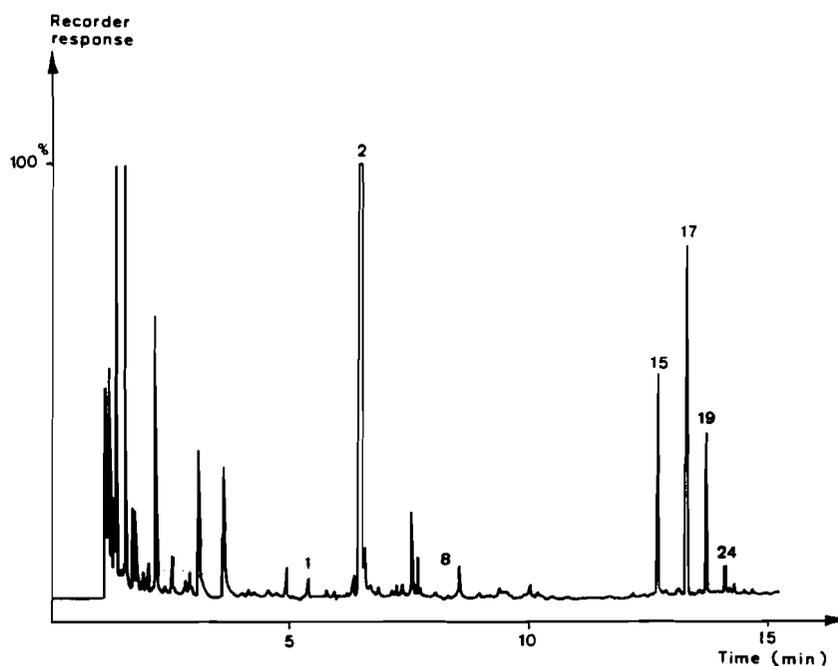


Fig. 4 Gas chromatogram of terpenic compounds isolated by adsorption on activated charcoal-graphite trap and microwave desorption from Papaya c.v. DB5. J and W. silica capillary column, 30 m  $\times$  0.25 mm (i.d.), operated at 60  $^{\circ}$ C for 10 min and then programmed to 250  $^{\circ}$ C at 4  $^{\circ}$ C/min. 1,  $\alpha$ -pinene; 2, myrcene; 8, ocimene; 15,  $\alpha$ -copaene; 17, caryophyllene; 19,  $\alpha$ -humulene; 24,  $\beta$ -selinene

bons; 44 to 82% of the volatiles for these two classes of compounds. A low level of 1-menthol was present in three varieties and particularly in Amelie c.v., in which it is an important volatile compound.

The qualitative results obtained using the dynamic headspace method are in good agreement with those obtained by SDE for the terpenic compounds. The compounds described as characteristic of a cultivar were generally present in the headspace of this variety. The other compounds detected in headspace are essentially esters as previously reported (28). The results obtained during the heating of African mango purée, showing a great increase in the  $\alpha$ -terpineol content (25), have lead us to postulate the presence of this alcohol in a glycosidically bound form in mango.

In order to obtain a confirmation of this assumption, the colorimetric aroma indexes determined after action of the vanillin-sulfuric reagent on the distillates obtained before and after acid hydrolysis of mango puree (23,24) were determined.

The results obtained (Table 4) show that bound compounds are present in all the varieties studied: these glycosidically bound components are important in the local mango and to a lesser degree in the Governor c.v., respectively 5.3 and 2.0 mg/kg, exprimed as linalool. These values, as well as the ratios between bound and free forms, are comparable to those obtained for aromatic grape cultivars (24,30).

Table 4 Free and bound volatile components for several African mango varieties determined after action of vanillin-sulfuric acid reagent (24) (results expressed in mg of linalool per kg of mango pulp)

| Cultivar | Terpene content |                  |                  | Bound/free |
|----------|-----------------|------------------|------------------|------------|
|          | Free components | Bound components | Total components |            |
| Mango    | 1.4             | 5.3              | 6.7              | 3.8        |
| Governor | 0.8             | 2.0              | 2.8              | 2.5        |
| Peach    | 0.2             | 0.4              | 0.6              | 2.0        |
| Papaya   | 0.4             | 1.0              | 1.4              | 2.5        |
| Muskat   | 0.4             | 0.9              | 1.3              | 2.3        |
| Amelie   | 0.6             | 1.0              | 1.6              | 1.6        |

In order to obtain some information about the nature of the bound compounds, glycosidic fractions were isolated from the African mango and Governor c.v. pulp (22). The volatile compounds produced after acidic hydrolysis separated by GC are given in Table 5.

According to these results, the presence of glycosidically bound  $\alpha$ -terpineol in the two mango varieties is confirmed, however, this component is not the most important. Linalool, *cis*-linalool furanoxide and 1-menthol are the main terpenic derivatives isolated among the compounds resulting from acidic hydrolysis. Small amounts of benzyl alcohol, previously reported in glycosidically bound form in grapes (31) and apricots (32) and of *trans*-linalool furanoxide, were found in the two fruits. Small amounts of geraniol glycoside were also detected in the local mango, the free alcohol being previously detected in a silica gel fraction obtained by Idstein and Schreier (4) from Alfonso mango.

However, some discrepancies exist between the results obtained by GC determinations and aroma index, for free terpenols. Two reasons may be responsible. Firstly, the results obtained using vanillin-sulfuric reagent are only indicative as quantifications were made using linalool as standard, whereas important variations concerning the molecular extinction coefficient of the different terpenic alcohols have been reported (24); the  $\epsilon_{\text{max}}$  value determined for 1-menthol  $200 \pm 20$  is very low relative to those given for  $\alpha$ -terpineol

Table 5 Volatile compound isolated by acid hydrolysis of the heterosidic fractions of two mango varieties and analysed by gas liquid chromatography (results expressed in relative percent)

| Compound                          | Mango variety |          |
|-----------------------------------|---------------|----------|
|                                   | Mango         | Governor |
| Benzyl alcohol                    | 3             | 2        |
| 1-Menthol                         | 15            | 30       |
| <i>cis</i> -Linalool furanoxide   | 15            | 20       |
| <i>trans</i> -Linalool furanoxide | 2             | 1.5      |
| Linalool                          | 17            | 10       |
| $\alpha$ -Terpineol               | 4             | 2        |
| Geraniol                          | <1            | —        |

(121 000 ± 300) and linalool (8470 ± 300) (24). Secondly, other components present among mango volatiles may contribute to the adsorption at 608 nm (24). More particularly, a low index value is obtained for Peach and Amelie c.v., whereas the terpenol content determined by GC is comparable or more significant than the terpenol content obtained for local mango characterized by a high index value. These results may be easily explained by the high 1-menthol content found for the two former cultivars.

The qualitative and quantitative differences found for terpenic compounds present in SDE extracts and in headspace of the several mango varieties studied are indicative of the contribution of these components to the intensity and the typicity of their particular aroma. On the other hand, the presence of glycosidically bound compounds in several mango c.v. being important was established and their isolation and their identification is presently in progress.

### Acknowledgements

The authors are indebted to Prof. H. Richard and Dr I. Noleau, Ecole Nationale des Industries Agricoles et Alimentaires, 91305 Massy, France, for the GC-MS determinations.

### References

- 1 ABD EL-BAKI, M. M., ASKAR, A., EL-SAMAHY, S. K. AND ABD EL-FADEL, M. G. Studies on mango flavor. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **77**, 139-142 (1981)
- 2 MACLEOD, A. J. AND DE TROCONIS, N. G. Volatile flavour components of mango fruit. *Phytochemistry*, **21**, 2523-2526 (1982)
- 3 ENGEL, K. H. AND TRESSL, R. Studies on the volatile components of two mango varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**, 796-801 (1983)
- 4 IDSTEIN, H. AND SCHREIER, P. Volatile constituents of Alphonso mango (*Mangifera indica*). *Phytochemistry*, **24**, 2313-2316 (1985)
- 5 MACLEOD, A. J. AND PIERIS, N. M. Comparison of the volatile components of some mango cultivars. *Phytochemistry*, **23**, 361-366 (1984)
- 6 BANDYOPADHYAY, C. AND GHOLAP, A. S. Relationship of aroma and flavour characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) to fatty acid composition. *Journal of Sciences of Food and Agriculture*, **24**, 1497-1503 (1973)
- 7 GHOLAP, A. S. AND BANDYOPADHYAY, C. Fatty acid biogenesis in ripening mango (*Mangifera indica* L. var. Alphonso). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**, 839-841 (1990)
- 8 MACLEOD, A. J. AND SNYDER, C. H. Volatile components of mango from Florida. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 380-384 (1985)
- 9 WILSON, C. W., SHAW, P. E. AND KNIGHT JR, R. J. Importance of some lactones and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone to mango (*Mangifera indica*) aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 1556-1559
- 10 PINO, J., ROSADO, A. AND SANCHEZ, R. Volatile components of three cultivars of mango from Cuba. *Nahrung*, **33**, 709-715 (1989)
- 11 SAKHO, M., CROUZET, J. AND SECK, S. Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **18**, 89-93 (1985)
- 12 CORDONNIER, R. AND BAYONOVE, C. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **278**, série D, 3387-3390 (1974)
- 13 WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B. AND MASSY-WESTROPP, R. W. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21**, 2013-2020 (1982)
- 14 ENGEL, K. H. AND TRESSL, R. Formation of aroma components from nonvolatile precursors in passion fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**, 998-1002 (1983)
- 15 HEIDLAS, J., LEHR, M., IDSTEIN, H. AND SCHREIER, P. Free and bound terpene compounds in papaya (*Carica papaya* L.) fruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32**, 1020-1021 (1984)
- 16 BUTTERY, R. G., TAKEOKA, G., TERANISHI, R. AND LING, L. C. Tomato aroma components: identification of glycoside hydrolysis volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 2050-2053 (1990)
- 17 WU, P., KUO, M. C., HARTMAN, T. G., ROSEN, R. T. AND HO, C. T. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 170-172 (1991)
- 18 SALLES, C., ESSAIED, H., CHALIER, P., JALLAGEAS, J. C. AND CROUZET, J. Evidence and characterization of glycosidically bound volatile components in fruits. In: SCHREIER, P. (Ed.), *Bio-flavor '87*. Berlin: Walter de Gruyter & Co., pp. 145-160 (1988)
- 19 SCHULTZ, T. H., FLATH, R. A., MON, T. R., EGGING, S. B. AND TERANISHI, R. Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25**, 446-449 (1977)
- 20 REKTORIK, J. Thermal desorption of solid trap by means of microwave energy. In: RIJKS, J. (Ed.), *Proceedings of 5th International Symposium on Capillary Chromatography*. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., pp. 396-405 (1983)
- 21 SALLES, C., JALLAGEAS, J. C. AND CROUZET, J. Chromatographic separation and partial identification of glycosidically bound volatile components of fruit. *Journal of Chromatography*, **522**, 255-265 (1990)
- 22 WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R. AND WILSON, B. Use of  $C_{18}$  reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and no-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *Journal of Chromatography*, **235**, 471-480 (1982)
- 23 LATRASSES, A. Qualité aromatique de la framboise (*Rubus idaeus* L.) II. Interprétation de l'indice d'arôme. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **15**, 49-51 (1982)
- 24 DIMITRIADIS, E. AND WILLIAMS, P. J. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **35**, 66-71 (1984)
- 25 SAKHO, M., CROUZET, J. AND SECK, S. Volatile components of African mango. *Journal of Food Science*, **50**, 548-550 (1985)
- 26 HUNTER, G. L. K., BUCEK, W. A. AND RADFORD, T. Volatile components of canned Alphonso mango. *Journal of Food Science*, **39**, 900-903 (1974)
- 27 DIAZ, N. A preliminary study on the flavor and aroma components of four mango varieties. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, **64**, 357-362 (1980)
- 28 BARTLEY, J. P. AND SCHWEDE, A. Volatile flavor components in the headspace of the Australian 'Bowen' mango. *Journal of Food Science*, **52**, 353-355-60 (1987)
- 29 ACKERMAN, L. G. J. AND TORLINE, P. A. Volatile components in the headspace of eight mango cultivars. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **17**, 339-341 (1984)
- 30 GUNATA, Y. Z., BAYONOVE, C. L., BAUMES, R. L. AND CORDONNIER, R. E. The aroma of grapes—I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography*, **331**, 83-90 (1985)
- 31 WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B. AND MASSY-WESTROPP, A. Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis vinifera* grapes. *Phytochemistry*, **22**, 2039-2041 (1983)
- 32 SALLES, C., JALLAGEAS, J. C., FOURNIER, F., TABEL, J. C. AND CROUZET, J. Apricot glycosidically bound volatile components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 1979-1983 (1991)

# CHAPITRE II

## II Les hétérosides précurseurs d'arôme de la mangue

### II-1 Les précurseurs d'arôme des végétaux

La mise en évidence de ces composés liés, précurseurs d'arôme, a été réalisée pour la première fois au début du siècle par Bourquelot et Bridel (1913) dans le *Pelargonium odoratissimum*, avec le  $\beta$ -D-glucoside de géraniol. Plus tard, en 1956, Cordonnier révèle la présence d'une fraction labile en milieu acide libérant des composés aromatiques dans le raisin Muscat. Ce n'est qu'en 1974 que Cordonnier et Bayonove confirment cette hypothèse et montrent que des terpènes sont libérés par hydrolyse enzymatique ou acido-catalysé du jus de raisin Muscat.

Ces composés précurseurs, découverts sous forme d'hétérosides, plus précisément de glycosides inodores, sont un potentiel d'arôme susceptibles d'être transformé en constituants volatils participant à l'arôme.

Depuis, divers travaux ont été entrepris dans ce domaine pour préciser la structure ou quantifier ces glycosides terpéniques et non terpéniques dans différents végétaux, notamment les fruits et les plantes aromatiques.

En effet, il a été démontré dans plusieurs fruits que la teneur des composés volatils sous forme liée était supérieure à celle de composés volatils libres (Tableau 3).

La méthode préconisée pour la détermination quantitative de ces substances volatiles « libres » et « liées » est celle de Dimitriadis et Williams (1984). Le principe est basé sur un dosage colorimétrique à 608 nm en présence de solution sulfurique de vanilline, des terpénols libres (avant acidification) et liés (après acidification) isolés de la pulpe de fruit par entraînement à la vapeur. La coloration se développe en 20 minutes à 60°C suivie d'un refroidissement à 25°C, et une courbe d'étalonnage obtenue avec une solution connue de linalol permet de déterminer la teneur de ces composés.

L'étude de ces précurseurs hétérosidiques a été effectuée sur le raisin ou le vin, Cordonnier et Bayonove (1974), Williams et al. (1980a, 1980b, 1982a, 1982b), Wilson et al. (1984, 1986), Günata et al. (1985, 1988), Salles (1989), Voirin et al. (1992a, 1992b). D'autres fruits ont été analysés : le fruit de la passion (Engel et Tressl, 1983b ; Winterhalter, 1990 ; Chassagne, 1996), la papaye (Heidlas et al., 1984 ; Schwab et al., 1989), le coing (Winterhalter

Tableau 3 : Composés volatils libres et liés dans divers fruits (en mg de linalol/kg de pulpe)

| Variétés                               | Origine             | Composés libres (1) | Composés liés (2) | Total (1+2) | Liés/libres (2/1) |
|--|---------------------|---------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| <b>Abricot<sup>a</sup></b>             |                     |                     |                   |             |                   |
| Bergeron                               | INRA Manduel        | 1,98                | 3,20              | 5,18        | 1,62              |
| Canino                                 | “ “ “               | 2,8                 | 3,58              | 6,38        | 1,28              |
| Rouge du Roussillon                    | “ “ “               | 1,48                | 7,61              | 9,09        | 5,14              |
| Précoce de Tyrinthe                    | “ “ “               | 0,58                | 3,15              | 3,73        | 5,43              |
| <b>Mangue<sup>b</sup></b>              |                     |                     |                   |             |                   |
| Mango                                  | Sénégal             | 1,4                 | 5,32              | 6,72        | 3,80              |
| Gouverneur                             | “ “                 | 0,84                | 2,00              | 2,84        | 2,38              |
| Amélie                                 | “ “                 | 0,63                | 1,05              | 1,68        | 1,66              |
| Papaye                                 | “ “                 | 0,37                | 0,95              | 1,32        | 2,56              |
| Pêche                                  | “ “                 | 0,21                | 0,40              | 0,61        | 1,90              |
| Muskat                                 | “ “                 | 0,36                | 0,84              | 1,20        | 2,30              |
| Indéterminée <sup>c</sup>              | Brésil              | 0,13                | 0,4               | 0,53        | 3,08              |
| <b>Fruit de la passion<sup>d</sup></b> |                     |                     |                   |             |                   |
| <b><u>Fruit pourpre</u></b>            |                     |                     |                   |             |                   |
| Indéterminée                           | Kenya               | 6,99                | 14,55             | 21,54       | 2,08              |
| Indéterminée                           | Zimbabwe            | 6,50                | 21,65             | 28,15       | 3,33              |
| Indéterminée                           | Burundi             | 7,1                 | 21,2              | 28,3        | 3                 |
| <b><u>Fruit jaune</u></b>              |                     |                     |                   |             |                   |
| Indéterminée                           | Colombie            | 10,5                | 5,82              | 16,32       | 0,55              |
| Indéterminée                           | Guyane              | 12                  | 10,67             | 22,67       | 0,89              |
| <b>Raisins</b>                         |                     |                     |                   |             |                   |
| Muscat d'Alexandrie <sup>e</sup>       | Australie           | 1,10                | 5,6               | 6,7         | 5,1               |
| Muscat à petits grains rouge           | Australie           | 0,93                | 3,1               | 4,03        | 3,3               |
| Muscat de Hambourg <sup>c</sup>        | INRA<br>Montpellier | 1,35                | 6,27              | 7,62        | 4,64              |
| Canada muscat <sup>e</sup>             | Australie           | 0,96                | 4,1               | 5,06        | 4,3               |
| Traminer                               | “                   | 0,54                | 1,9               | 2,44        | 3,5               |

a : Chalier (1987)

b : Koulibaly (1989)

c : Essaied (1985)

d : Fontvielle (1989)

e : Dimitriadis et Williams (1984)

et *al.*, 1988a ; Güldner et Winterhalter, 1991 ; Lutz et Winterhalter, 1993). Des travaux ont été également effectués sur l'abricot (Salles et *al.*, 1990a), la pomme (Schwab et Schreier, 1990 ; Herderich et *al.*, 1992), l'ananas (Wu et *al.*, 1991), la framboise (Pabst et *al.*, 1991), le hog plum (Adedeji et *al.*, 1991), le lulo (solanaceae) par Suárez et *al.*(1991), les mûres (Humpf et Schreier, 1991), et la tomate (Marlatt et *al.*, 1992). Des études ont été entreprises dans ce domaine sur les feuilles : les feuilles de thé (Guo et *al.*, 1993 ; He et *al.*, 1994), les feuilles de vigne (Skouroumounis et Winterhalter, 1994) en particulier.

Très peu d'études ont été réalisées sur les hétérosides de mangue dont la présence a été suspectée dès 1985 par Sakho et *al.*(b), Salles et *al.* (1988) mettent en évidence la présence de ces précurseurs dans la mangue. Plus tard Adedeji et *al.* (1992) isolent des glycosides et identifient les aglycones libérés après hydrolyse enzymatique, aglycones constitués de monoterpénols, d'aldéhydes, d'acide, d'esters et de C13 norisoprénoides. Par ailleurs Koulibaly et *al.* (1992) déterminent le pool d'hétérosides dans six variétés de mangues d'origine africaine et ils procèdent à l'hydrolyse acide des glycosides de deux variétés « mango » et « Gouverneur ». Ils identifient des monoterpénols comme aglycones. Récemment, Sakho et *al.* (1997a) ont établi la structure d'un certain nombre d'hétérosides présents dans la mangue (mango).

### **II-1-1 La partie aglycone**

Les hétérosides terpéniques et les polyols terpéniques tels que les 3,7 diméthyl oct-1-en-3,7 diol ; 3,7 diméthyl octa-1,7 dien-3,6 diol et 3,7 diméthyl octa-1,7dien-3,6 diol et 3,7 diméthyl oct-1-en-3,6,7 triol libèrent des composés volatils à la suite d'hydrolyse ou de traitement thermique en milieu faiblement acide (réaction acido-catalysée) (Engel et Tressl, 1983b). Ces composés appartiennent principalement à la famille des alcools monoterpéniques (géraniol, nérol, linalol,  $\alpha$ -terpinéol et citronello) responsables d'une agréable note fruitée ou florale (Williams et *al.* 1980a, 1980b, 1982a, 1982b). Des dérivés monoterpéniques sous forme oxydée, oxydes de linalol par exemple, ont été identifiés comme aglycone, de même que des alcools tels que alcool benzylique et 2-phényléthanol (Williams et *al.*, 1983) ; des C13 norisoprénoides (Strauss et *al.* 1987, Winterhalter et *al.* 1988a, Sefton et *al.* 1989 ; Winterhalter et *al.* 1990) et aussi des composés phénoliques (Chassagne, 1996).

### **II-1-2 La partie glucidique**

Elle est généralement constituée d'une unité de D-glucose ( $\beta$ -D-glucopyranosyl) liée à l'aglycone par une liaison  $\beta$ -osidique. Le glucose peut être associé à un ou deux oses, et les résidus terminaux sont rattachés au glucose par une liaison 1-6.

Dans le raisin des diholosides ont été identifiés par Williams et *al.* (1982) :

- $\alpha$ -L rhamnopyranosyl-6- $\beta$ -D-glucopyranose ou rutinose,
- $\alpha$ -L- arabinofuranosyl-6- $\beta$ -D glucopyranose (Salles, 1989), de même que dans l'abricot.

D'autres résidus terminaux de diholosides ont été mis en évidence :

- $\beta$ -D-xylopyranosyl (Schwab et Schreier, 1990) dans la pomme,
- $\beta$ -D-apiofuranosyl (Voirin et *al.*, 1990) dans le raisin,
- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (Pabst et *al.*, 1991) dans la framboise, dans le fruit de la passion (Chassagne, 1996),
- $\beta$ -D-glucopyranosyl (Winterhalter et *al.*, 1991) dans le coing.

Récemment Herderich et *al.* (1992) ont signalé la présence d'un triholoside de vomifoliol dans la pomme :  $\beta$ -D-glucopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-6-O- $\beta$ -D-glucopyranose.

Par conséquent, des rutinoides (glucose + rhamnose), des vicianosides (glucose + arabinopyranose), des apiosides (glucose + apiose), des primevèrosides (glucose + xylose) et des gentiobiosides (glucose + glucose) ont été identifiés comme constituants de la partie glucidique de ces hétérosides précurseurs d'arôme (Fig. 2).

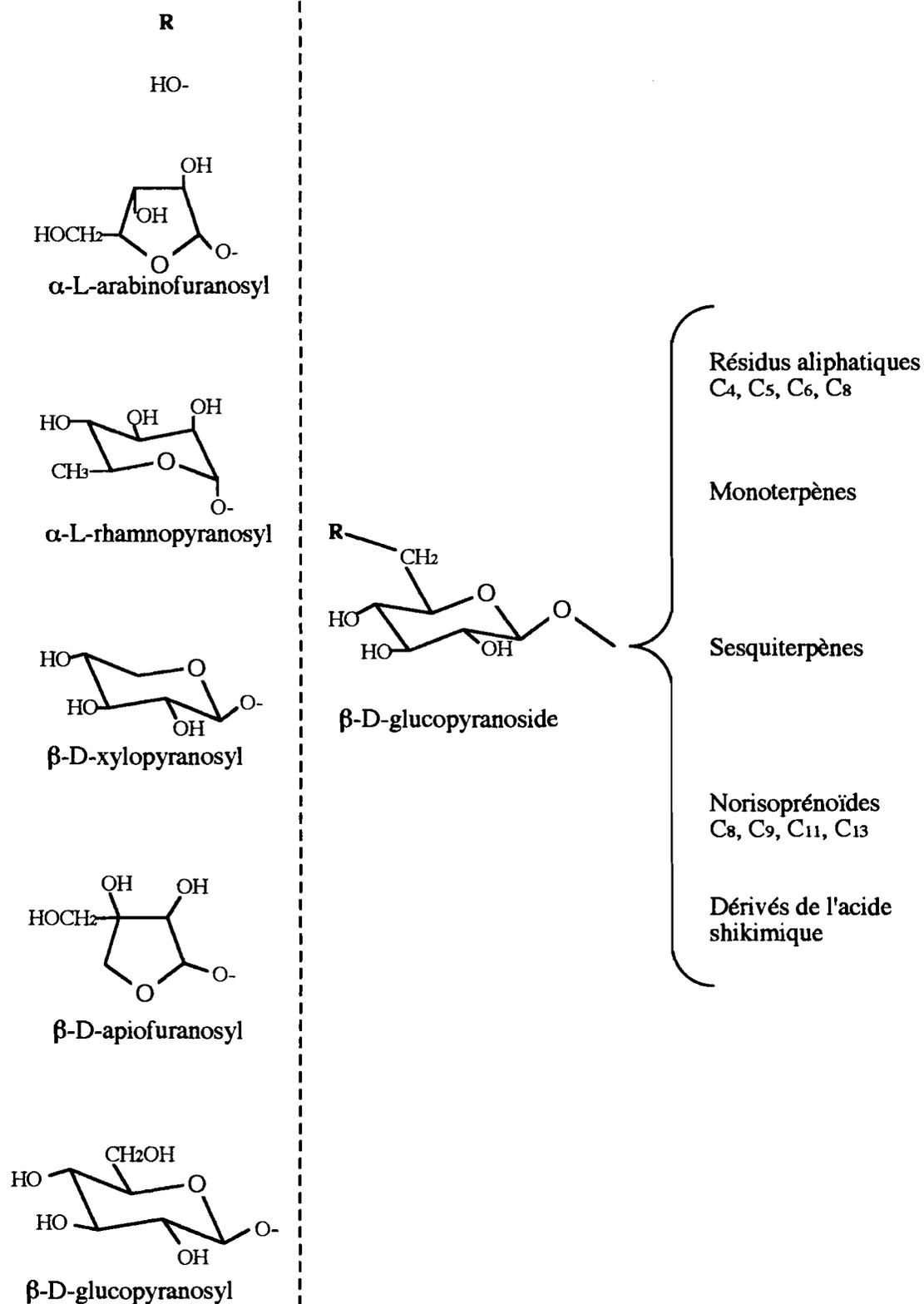
Afin d'exploiter ce potentiel d'arôme, il est nécessaire de procéder à une détermination qualitative et quantitative de ces glycosides.

### **II-1-3 Analyse des hétérosides après hydrolyse**

Une extraction préalable permet d'isoler un pool d'hétérosides qui sera soumis à l'analyse.

La technique la plus utilisée est celle basée sur la chromatographie d'adsorption mettant en jeu la rétention sélective des hétérosides soit sur silice greffée C<sub>18</sub>, soit sur Amberlite XAD-2 (Williams et *al.*, 1981 ; Günata et *al.*, 1985).

Après isolement de ces composés glycosidiques ou fraction liée, il est plus aisé de procéder à l'analyse des oses et des aglycones libérés par hydrolyse acide (Koulibaly, 1989) ou enzymatique (Günata et *al.*, 1985 ; Fabre et Ambid, 1988) d'une part et d'autre part à l'étude structurale complète de ces hétérosides après dérivation.



**Figure 2 : Nature des glycosides identifiés comme précurseurs d'arôme dans divers fruits.**

L'identification de ces hétérosides repose sur l'analyse chromatographique couplée ou non à la spectrométrie de masse.

### **L'hydrolyse acide**

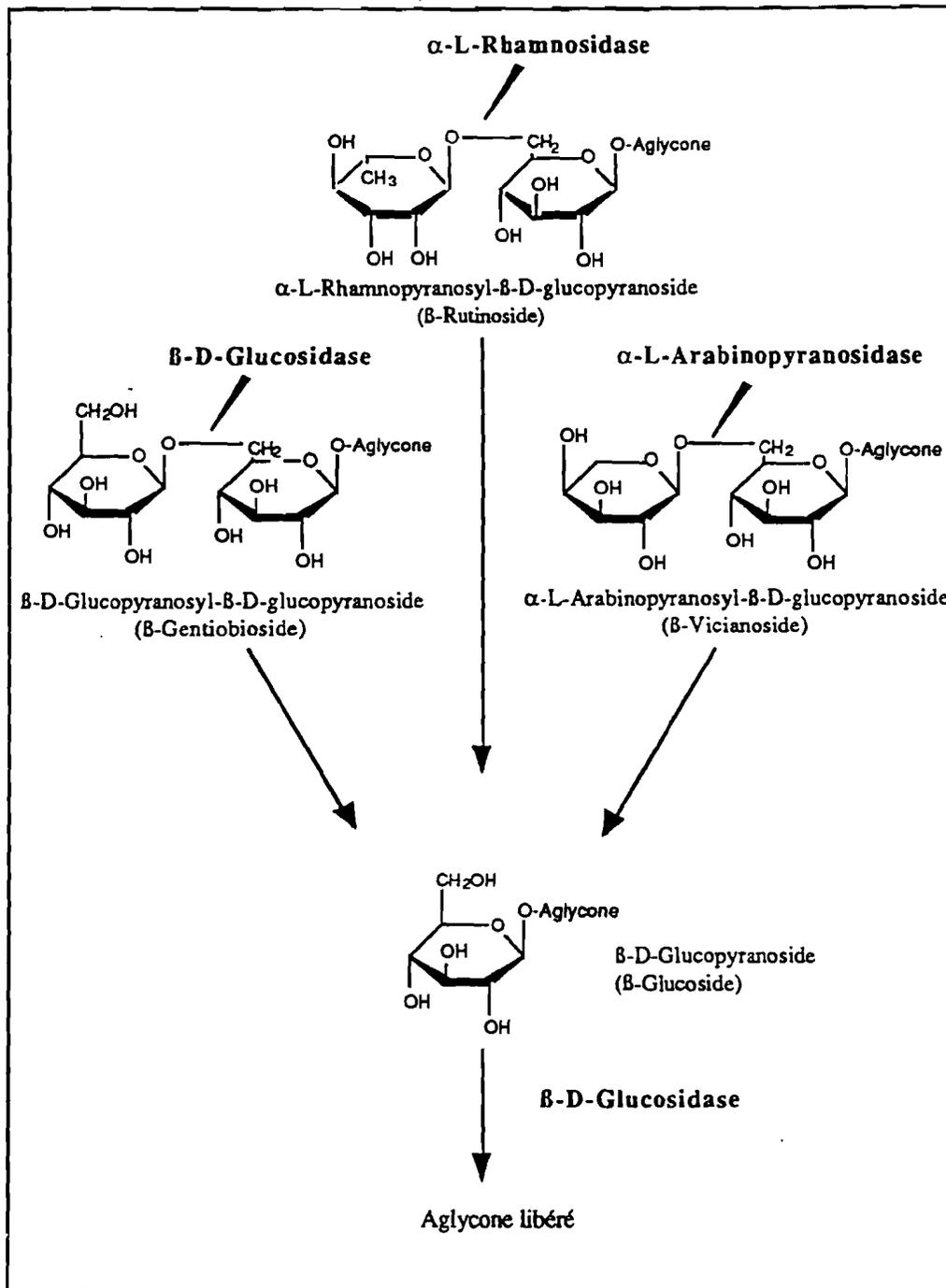
L'hydrolyse acide des glycosides s'avère très efficace et permet une identification facile aussi bien des aglycones que des oses libérés. Cependant, il existe des possibilités de réarrangements acido-catalysés des aglycones conduisant ainsi à la formation de composés différents de ceux qui étaient liés (Williams et *al.*, 1982b), donc loin de la note aromatique. Par contre, cette hydrolyse acide n'entraîne pas de modifications moléculaires des oses (Albersheim et *al.*, 1967) et permet donc une identification aisée des oses et également un dosage qualitatif et quantitatif par transformation des oses en acétate d'alditol. Elle est souvent utilisée pour la détermination structurale de polysaccharides (Hakomori, 1964 ; Jansson et *al.*, 1976 ; Brillouet et *al.*, 1989). Cependant, elle ne donne pas d'indication sur la nature de liaisons osidiques. Ce qui justifie l'application de la perméthylation des oses partiellement acétylés, une technique qui permet de déterminer la nature des formes cycliques furaniques ou pyraniques ainsi que la position des liaisons entre les éléments osidiques.

### **L'hydrolyse enzymatique**

Technique de bioconversion douce, l'hydrolyse enzymatique, contrairement à l'hydrolyse acide, ne conduit pas à des réarrangements moléculaires des aglycones libérés (Williams et *al.*, 1982b ; Günata et *al.*, 1985). Elle est plus délicate et s'effectue de manière séquentielle.

Une glycosidase libère d'abord l'ose terminal qui peut être selon la nature du sucre, une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ou une  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase, après une  $\beta$ -D-glucopyranosidase intervient pour détacher l'aglycone (Fig 3). Ainsi les produits d'hydrolyse dépendent énormément de la spécificité des enzymes utilisées et également de la composition des préparations enzymatiques mises en jeu. De ce fait, le profil des aglycones libérés peut varier pour un même extrait glycosidique, mais tout de même plus fidèle des composés liés.

Toutefois cette méthode présente des limites dues à la spécificité plus ou moins étroite des glycosidases (Günata, 1984 ; Hartmann-Schreier et Schreier, 1987) dont le mode d'action peut dépendre de la nature de la copule osidique ou de l'aglycone et de l'inhibition de certaines enzymes par les oses produits lors de la réaction ou par certains composés biologiques de l'extrait végétal (Keleman et Whelan, 1966).



**Figure 3** : Mécanisme d'hydrolyse des principaux glycosides du fruit de la passion, établi selon celui démontré par Günata et *al.* (1988) pour l'hydrolyse des glycosides de terpénols.

Par ailleurs, des risques d'oxydation peuvent survenir lors de la libération des aglycones par les enzymes d'origine fongique notamment au niveau de certains composés norisopréniques. En effet, Sefton et Williams (1991) ont mis en évidence la formation de 3-oxo- $\alpha$ -damascone et 3-oxo- $\beta$ -damascone, produits d'oxydation de la 3-hydroxy- $\beta$ -damascone qui accompagnait la perte de ce dernier lors d'hydrolyse enzymatique d'une fraction glycosidique des jus de raisin variété Chardonnay par Rohapect C, D5L et Novoform 12 (préparations enzymatiques d'origine fongique).

#### **II-1- 4 Analyse directe des glycosides**

Après extraction et purification, les hétérosides peuvent être analysés directement par CPG ou CPG-SM sans hydrolyse, après dérivation par triméthylsilylation ou trifluoroacétylation (Voirin et *al.*, 1992a). Des glycosides de référence commercialisés ou synthétisés permettent une identification aisée selon les règles de fragmentation déduites de l'étude de ces composés témoins en SM ou CPG-SM, particulièrement en impact électronique (Voirin, 1990) ou en ionisation chimique (Chassagne et *al.*, 1995). Cette technique d'analyse rapide a conduit à l'identification de certains précurseurs du vin (Voirin, 1990 ; Baumes et *al.*, 1993) du fruit de la passion (Chassagne, 1996).

Toutefois, il convient de souligner que pour un milieu complexe comme les extraits végétaux ou pour un mélange de plusieurs composés, un fractionnement chromatographique préalable est nécessaire avant l'analyse structurale. Ainsi Salles et *al.* (1990a) ont procédé par chromatographie sur fractogel TSK HW 40.S, par chromatographie sous pression sur couche mince de silice, à la séparation des glycosides et rutinosides des alcools terpéniques et aromatiques de synthèse. Ce qui a permis la purification de plusieurs hétérosides précurseurs d'arôme du raisin et de l'abricot, facilitant ainsi l'analyse structurale par la spectrométrie de masse et en couplage masse-masse.

D'autres méthodes de fractionnement ont été utilisées telle la chromatographie à contre courant (Strauss et *al.*, 1987a) et ses variantes.

## **II-2 Les hétérosides précurseurs d'arôme de mangue**

Comme nous l'avons souligné, très peu d'études ont été réalisées sur les glycosides de mangue. Ces composés mis en évidence de façon indiscutable par les travaux de Koulibaly et *al.* (1992) et Adedeji et *al.* (1992) ont été étudiés en détail par Sakho et *al.* (1997) publication n°3. Dans les pages qui suivent nous avons développé un certain nombre de points qui ne sont pas donnés dans cette publication.

Ainsi, dans le but d'identifier les hétérosides de la mangue, nous avons entrepris des analyses sur la partie glucidique : analyse en CCM, dosage des oses neutres constitutifs , analyse de structure par perméthylation. Nous avons étudié la partie aglycone libérée par action d'enzymes à spectre d'activité très large. Enfin l'analyse des hétérosides après dérivation, a été réalisée par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CPG-SM ) en impact électronique (EI) et ionisation chimique mode négative (ICN).

## **II-2-1 Etude de la partie glucidique**

### **II-2-1-1 Composition en oses**

#### **II-2-1-1-1 Analyse en CCM**

L'extrait d'hétérosides de la pulpe de mangue soumis à l'analyse chromatographique sur couche mince de silice avant et après hydrolyse totale, par l'acide trifluoroacétique (TFA) (Fig 4 et 5), permet d'avoir une première idée de la composition en oses. Selon Salles et *al.* (1990b) les glucosides après révélation au NEDIAC [N-(Naphtyl-1)-éthylènediamine dihydrochlorure], prennent une couleur rouge violet, le glucose mauve, le rhamnose jaune et l'arabinose grise. L'extrait glycosidique avant hydrolyse présente des taches dont les principales ont un facteur de rétention (Rf) supérieur à 0,5 et d'après la couleur, il s'agit probablement de glucosides.

L'hydrolyse acide totale par TFA de l'extrait a permis de mettre en évidence une seule tache importante qui, par rapport aux témoins, correspondrait à du glucose.

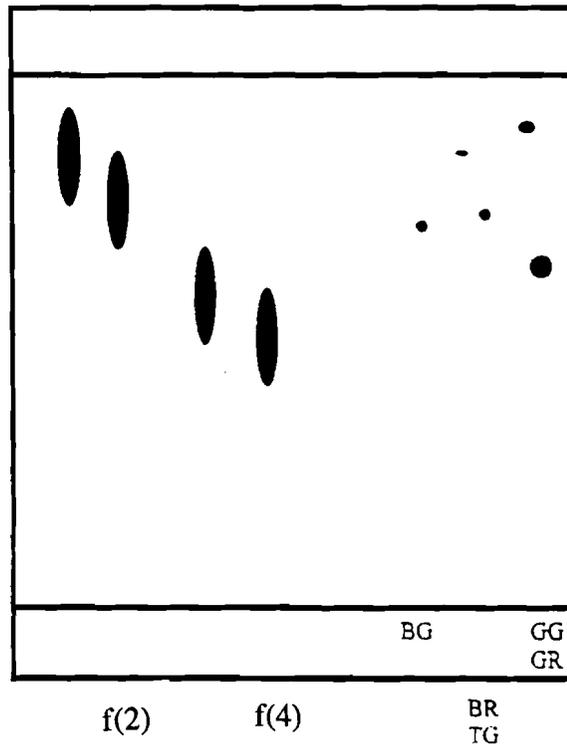
L'hydrolysats enzymatique par la pectinase d'*Aspergillus niger* de ces hétérosides, sur couche mince, révèle également des taches mauves comparables au glucose en plus des taches au niveau des glucosides. Ce qui laisse supposer que l'hydrolyse enzymatique n'est pas totale.

Afin de purifier l'extrait hétérosidique et de rendre aisé les identifications, nous avons procédé au fractionnement du pool glycosidique par chromatographie liquide sur colonne.

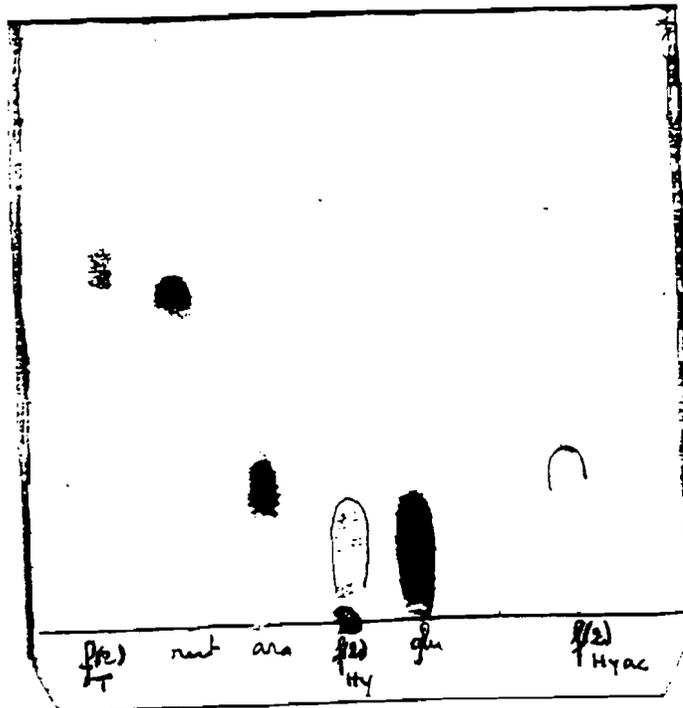
L'opération nous a permis d'obtenir quatre sous fractions de composés liés (Fig 4) et les analyses sur couche mince confirment les constatations ci-dessus.

#### **II-2-1-1-2 Détermination des oses après hydrolyse acide en CPG**

L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique (TFA) puis dérivation des oses libérés par triméthylsilylation (TMS) a permis de mettre en évidence les oses constitutifs des glycosides.



**Figure 4** : CCM des quatre sous fractions liées isolées après fractionnement sur gel de silice : f(1), f(2), f(3), f(4). Témoins: Benzylglucoside (BG), Benzylrutinoside (BR), Terpénylglucoside (TG), Géranylglucoside (GG), Géranylrutinoside (GR)



**Figure 5** : CCM de la sous fraction liée f(2) après hydrolyse enzymatique (f(2) Hy), après hydrolyse acide (f(2) Hyac). Témoin sans enzyme (f(2)T). Témoins sucre: arabinose (ara), glucose (glu), rhamnose (rha)

L'identification après injection en CPG, par comparaison du temps de rétention relative (TRR par rapport au phényl-β-D-glycoside utilisé comme étalon interne) avec ceux de composés de référence, révèle la présence, sous les deux formes anomériques, de l'arabinose, du rhamnose, du xylose, du glucose, du galactose et de l'apiose.

### II-2-1-1-3 Détermination des oses après transformation en acétate d'alditol

Les oses libérés après hydrolyse acide de l'extrait hétérosidique sont réduits en alcool et les alditoles formés sont dérivés en acétates volatils (Fig 6). L'identification par comparaison de leur temps de rétention relatif avec ceux de dérivés d'oses témoins, sur deux colonnes DB5 et DB 225 a permis de confirmer la présence des oses détectés après hydrolyse acide (tableau 4). L'utilisation des deux colonnes permet d'élucider les problèmes posés par la coélution de certains dérivés. En effet, les dérivés du xylose et de l'apiose, coélus sur colonne DB 225 sont séparés sur colonne DB5.

Tableau 4 : Composition en oses neutres de l'extrait glycosidique de la pulpe de mangue

| Ose       | mg/kg | % molaire relatif |
|-----------|-------|-------------------|
| Arabinose | 7,8   | 9,8               |
| Xylose    | 2,6   | 3,2               |
| Apiose    | 1,5   | 1,9               |
| Rhamnose  | 0,9   | 0,9               |
| Galactose | 1,5   | 1,5               |
| Glucose   | 79,1  | 82,7              |

Les résultats du tableau indiquent la prédominance quantitative du glucose et de l'arabinose qui constituent plus de 90 % des oses totaux et que le glucose représente à lui seul plus de 80 %. Ce qui pourrait justifier qu'il soit le seul ose détecté sur chromatographie sur couche mince, après hydrolyse.

### II-2-1-2 Etude structurale des glycosides par perméthylation

La perméthylation d'un polyoside permet de déterminer la nature des liaisons entre les différents résidus osidiques ainsi que leur enchaînement. La méthode utilisée est celle de Hakomori (1964) reprise par Jansson et *al.* (1976). Les hétérosides sont méthylés puis réduits après hydrolyse acide en éthers méthyliques d'alditol et ensuite dérivés en acétate avant d'être injectés en CPG (Fig 7).

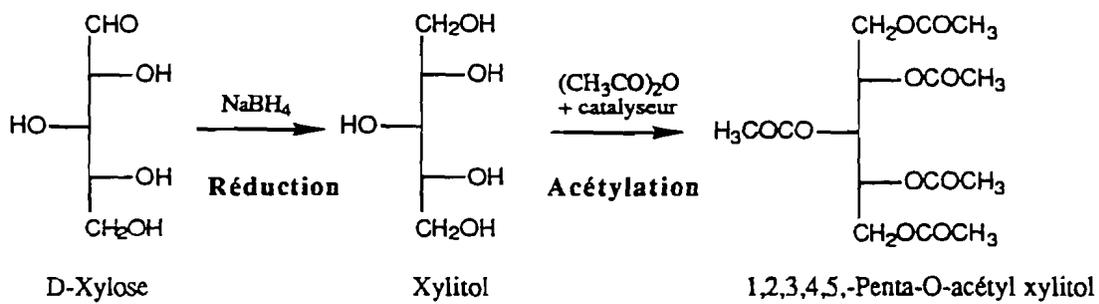
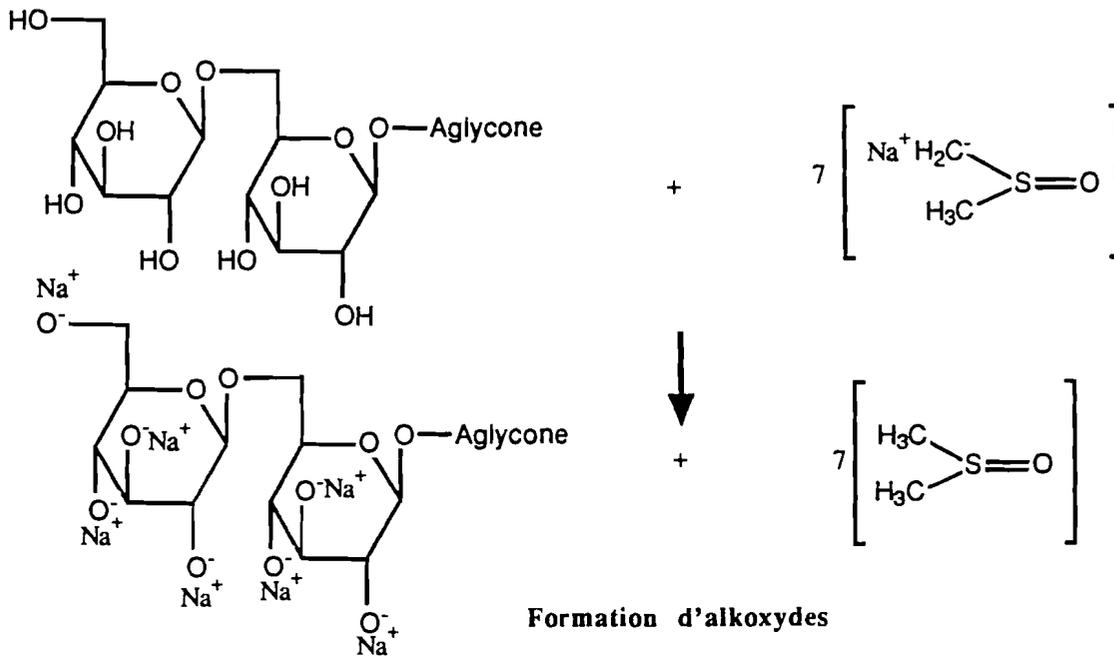


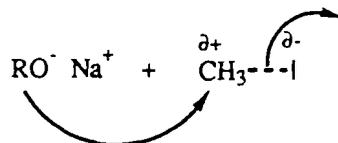
Figure :6 Séquence chimique pour la préparation des acétates d'alditol (exemple du xylose)



Formation de l'anion



Formation d'alkoxydes



Attaque de ICH<sub>3</sub> par les alkoxydes

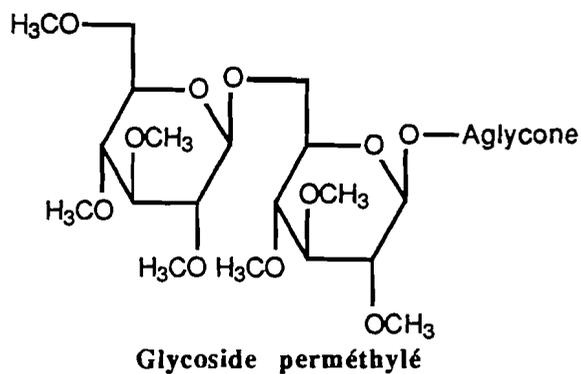


Figure 7 : Réactions de méthylation des glycosides

L'identification par comparaison des temps de rétention relatifs des éthers méthyliques témoins (Saulnier, 1987), avec ceux de l'extrait glycosidique total, a permis de mettre en évidence dans l'extrait, six dérivés méthylés. Les spectres de masse et les fragmentations des acétates d'alditol partiellement méthylés (Bjorndal et *al.*, 1970) obtenus, confirment l'identification (tableau 5).

Tableau 5 : Spectres de masse des acétates d'alditol méthylés des glycosides de la mangue

| Ether méthylique acétylé                | Ions fragments<br>(abondance relative)   | TRR*  |
|---|--|-------|
| 2,3,5-Tri- <i>O</i> -méthyl-arabinose   | 117(100)-101(92)-87(52)-129(20)-71(20)   | 0,234 |
| 2,3,3'-Tri- <i>O</i> -méthyl-apiose     | 101(100)-117(84)-99(52)-131(21)-161(17)-<br>87(17)-58(10)-72(7)-75(7)-173(3)   | 0,274 |
| 2,3,4-Tri- <i>O</i> -méthyl-rhamnose    | 117(100)-101(95)-58(14)-131(12)-87(12)-<br>161(11)                             | 0,278 |
| 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -méthyl-glucose | 101(100)-117(28)-87(25)-161(20)-129(15)-<br>145(13)-71(11)-205(9)              | 0,487 |
| 3,4,6-Tri- <i>O</i> -méthyl-glucose     | 129(100)-87(87)-189(42)-101(39)-99(38)-<br>161(27)-71(19)-113(7)-145(6)-173(4) | 0,630 |
| 2,3,4-Tri- <i>O</i> -méthyl-glucose     | 101(100)-99(59)-117(41)-87(38)-129(17)-<br>161(10)-189(10)-71(9)               | 0,692 |

\* Temps de rétention relatifs par rapport au dérivé méthylé de l'inositol (étalon interne) sur colonne DB5

D'après ces résultats (Tableau 6) nous constatons que les éthers méthyliques du glucose sont prédominants et se répartissent en 2,3,4,6-Tétra-*O*-méthyl-glucose, 2,3,4-Tri-*O*-méthyl-glucose et 3,4,6-Tri-*O*-méthyl-glucose. Ils montrent ainsi qu'ils sont présents sous forme de résidus terminaux non réducteurs (2,3,4,6-Tétra-*O*-méthyl-glucose), sous forme liée à l'aglycone (2,3,4-Tri-*O*-méthyl-glucose) en 1-6 d'une part ou en 1-2 d'autre part avec 3,4-6-Tri-*O*-méthyl-glucose.

Par contre l'arabinose, l'apiose, le rhamnose ont donné chacun un seul dérivé : 2,3,5-Tri-*O*-méthyl-arabinose, 2,3,3'-Tri-*O*-méthyl-apiose et 2,3,4-Tri-*O*-méthyl rhamnose respectivement. Ils sont tous terminaux et non réducteurs et sous la forme furanose pour l'arabinose et l'apiose et pyranose pour le rhamnose.

Tableau 6 : Dérivés méthylés des glycosides de mangue

| Ether méthylique                        | %     |
|---|-------|
| 2,3,5-Tri- <i>O</i> -méthyl-arabinose   | 7,3   |
| 2,3,3'-Tri- <i>O</i> -méthyl-apiose     | 3,7   |
| 2,3,4-Tri- <i>O</i> -méthyl-rhamnose    | 1,2   |
| 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -méthyl-glucose | 64,6  |
| 3,4,6-Tri- <i>O</i> -méthyl-glucose     | 4,5   |
| 2,3,4-Tri- <i>O</i> -méthyl-glucose     | 18,7  |
| Total                                   | 100,0 |

En se référant aux travaux antérieurs d'identification des hétérosides dans divers fruits (Williams et *al.*, 1982a, 1983 ; Schwab et *al.*, 1989, 1990 ; Pabst et *al.*, 1991, 1992a, 1992b ; Winterhalter et *al.*, 1991) et aux hypothèses d'après lesquelles les glycosides précurseurs d'arôme existent principalement sous forme de monoglucosides et de diglycosides et que le glucose est toujours lié à l'aglycone, on peut établir des structures. Ainsi nous pouvons suggérer que l'arabinose, l'apiose et le rhamnose terminaux pourraient être liés au C<sub>6</sub> du glucose formant des arabinofuranosyl-glucosides, des apiosyl-glucosides et des rhamnosyl-glucosides. L'excès de glucose terminal pourrait être lié avec les glucoses intermédiaires formant ainsi des glucosyl-glucosides ou gentiobiosides. Ce composé a été signalé auparavant dans les hétérosides du fruit du cognassier (*Cydonia oblonga*) par Winterhalter et *al.* (1991) du fruit de la passion par Chassagne (1996).

Le reste du glucose terminal formerait les monoglucosides, c'est-à-dire lié directement à l'aglycone.

Tableau 7 : Structures possibles de la partie osidique des glycosides de la mangue

| Glycosides                                   | % molaire relatif |
|--|-------------------|
| Glucopyranoside (monoglucoside)              | 69,8              |
| Glucopyranosyl-glucopyranose (gentiobioside) | 14,4              |
| Arabinofuranosyl-glucopyranose (arabinoside) | 9,5               |
| Apiofuranosyl-glucopyranoside (apioside)     | 4,8               |
| Rhamnopyranosyl-glucopyranoside (rutinoside) | 1,5               |

Le tableau 7 présente les structures possibles de la partie osidique des glycosides de la pulpe de mangue. Nous constatons que les monoglucosides représentent environ 70 % des composés, les 30 % restant étant des diglycosides. Néanmoins, il faut souligner que dans cette hypothèse, le xylose a été éliminé car aucun éther méthylique n'a été détecté alors qu'il a été identifié comme ose neutre constitutif des hétérosides de la mangue. Il se peut qu'une coélution soit intervenue avec un éther d'arabinose : les deux dérivés ayant des spectres de masse semblables.

Par ailleurs, on a relevé aucun éther méthylique de galactose pourtant présent également dans la composition en oses neutres.

La fraction liée de la mangue serait donc constituée globalement de monoglucosides et de diglycosides. Ces structures sont comparables à celles des hétérosides de fruits étudiés par ailleurs :

- arabinosides, rutinosides, dans le raisin (Williams et *al.*, 1982a ; Günata et *al.*, 1988 ; Voirin, 1990), dans l'abricot (Salles, 1989), dans le fruit de la passion (Chassagne et *al.*, 1995) ;
- apiosides dans le raisin (Voirin, 1990) ;
- gentiobiosides dans le fruit du cognassier (Winterhalter et *al.*, 1991) et de la passion (Chassagne, 1996).

## II-2-2 Etude de la partie aglycone

L'essentiel des résultats obtenus est donné dans la publication n°3 (Sakho M., Chassagne D., Crouzet J. 1997. African Mango Glycosidically Bound Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 883-888).

L'objet du présent paragraphe est de donner un certain nombre de données complémentaires concernant cette fraction.

# African Mango Glycosidically Bound Volatile Compounds

M. Sakho,<sup>†</sup> D. Chassagne,<sup>‡</sup> and J. Crouzet<sup>\*‡</sup>

Ecole Nationale Supérieure Universitaire de Technologie, B.P. 5085, Dakar, Sénégal, and Laboratoire de Génie Biologique et Sciences des Aliments, Unité de Microbiologie Industrielles Associée à l'INRA, Université de Montpellier II, F-34095 Montpellier Cédex 05, France

Carbohydrate and aglycon moieties released, respectively, by acid and enzymatic hydrolysis of African mango pulp extracts containing glycosidically bound compounds were identified by TLC, GC, and GC/MS. Glucose was found to be the most important sugar constituent of the glycoside saccharidic moiety, while significant amounts of arabinose and trace amounts of rhamnose were detected. Several aglycons [(*Z*)-hexen-3-ol, hexanol, hexanoic acid, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3-(2*H*)furanone (furanol), linalool oxides,  $\alpha$ -terpineol, carvacrol, vanillin, *cis*- and *trans*-6-*p*-menthen-2,8-diol, 1,8-*p*-menthadien-7-ol, 1-*p*-menthen-7,8-diol, and 9-hydroxymegastima-4-en-3-one] were identified as additional mango bound volatile compounds. Fatty acids (myristic and stearic acids) were also found in glycosidically bound form. Ten glycosides (benzyl, 2-phenylethyl, and  $\alpha$ -terpineyl glucosides and rutinoides, eugenyl, vanillyl and furanoyl glucosides and  $\alpha$ -terpineyl arabinoglucoside) were identified for the first time in mango by GC/MS of trifluoroacetylated derivatives and GC using reference compounds. Linalyl oxide glucosides (four isomers) and C<sub>13</sub> norisoprenoid derivatives [9-hydroxymegastima-4,6-dien-3-one (two isomers), 9-hydroxymegastima-4,7-dien-3-one, and vomifoliol glucosides and arabinoglucosides] were tentatively identified.

**Keywords:** *Mango; glycosidically bound compounds; TFA derivatives; GC/MS*

## INTRODUCTION

The presence of glycosidically bound volatile compounds in plants has been well established (Stahl-Biskup, 1987). These compounds are able to release free aroma compounds by enzymatic or acid hydrolysis and in fruits can be considered as aroma precursors. There has been much recent research on fruit and in particular on tropical fruit glycosidically bound compounds (Engel and Tressl, 1983; Schwab et al., 1989; Winterhalter, 1990; Wu et al., 1991; Adedeji et al., 1992; Koulibaly et al., 1992).

Glycosidically bound volatiles were simultaneously detected in African mango by Adedeji et al. (1992) and Koulibaly et al. (1992). Thirty-three volatile compounds were detected by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of the enzymatically released aglycons: 8 monoterpene alcohols, 5 aldehydes, 5 acids, 7 hydroxy esters, 5 C<sub>13</sub> norisoprenoids, and 3 miscellaneous compounds (Adedeji et al., 1992). Bound volatile compounds were present in differing quantities in six mango varieties, the ratio between free and bound forms varying from 1.6 to 3.8. These values are similar to those reported for aromatic grape and apricot cultivars (Gunata et al., 1985; Salles et al., 1989). Several aglycons were identified in an acid-hydrolyzed heterosidic pooled isolate obtained from two component-rich varieties, mango obtained from ungrafted trees and mango of Governor variety (Koulibaly et al., 1992). Research into mango glycosidically bound compounds has been hampered by the lack of knowledge concerning the structure of heterosidic compounds.

Knowledge of the saccharidic moiety structure is necessary to control the enzymatic hydrolysis of glyco-

sidically bound volatile compounds. It has been shown (Gunata et al., 1988) that hydrolysis takes place in a sequential manner: the terminal carbohydrate unit is released by the action of a specific glycosidase; then a carbohydrate unit, reported today as a glucose unit linked to the aglycon, is hydrolyzed and released by the action of a  $\beta$ -glucosidase.

This study investigates glycosidically bound volatile compounds, isolated from African mangoes obtained from ungrafted trees (Sakho et al., 1985a,b; Koulibaly et al., 1992). TLC, GC, and GC/MS of saccharides and aglycons released by acid and enzymatic hydrolysis of heterosidic compounds and GC/MS of trifluoroacetylated derivatives were used.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** The solvents (*n*-pentane, diethyl ether, 2-propanol, and chloroform) were of pure grade (purity >97.7%) from Merck (Darmstadt, Germany); acetonitrile, methanol, and ethyl acetate were of HPLC grade from Rathburn (Walkerburn, Scotland). Ammonia was from Merck.

*n*-Paraffins C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>, purity >95.5%, were from Fluka (Buchs, Switzerland).

Trimethylsilylating (TMS) reagent [*N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide chloromethylsilane, (99:1)] and trifluoroacetylating (TFA) reagent [*N*-methylbis(trifluoroacetamide)] were Pierce (Rockford, IL).

Amberlite XAD-2 (20-60 mesh), obtained from Röhm and Hass (Philadelphia, PA) was treated according to the procedure of Gunata et al. (1985).

Chromagel 60 A GC silica gel (230-400 mesh) was from Solvants, Documentation, Synthèse (Peypin, France).

Insoluble poly(vinylpyrrolidone) Polyclar AT was a Serva (Heidelberg, Germany) product.

TLC was performed on 0.2 mm precoated silica plates (Kieselgel 60, Merck). Saccharidic compounds were revealed using *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, Nediace reagent (Merck).

*Aspergillus niger* pectinase and cellulase were from Sigma (St. Louis, MO) and Rohapect D5L was from Röhm (Darmstadt, Germany).

\* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail crouzet@gsa.arpb.univ-montp2.fr).

<sup>†</sup> Ecole Nationale Supérieure Universitaire de Technologie.

<sup>‡</sup> Université de Montpellier II.

**Plant Material.** Mango fruit used in this study were obtained from ungrafted trees growing in an orchard located near Dakar, Sénégal. Fruits, gathered when fully ripe, were washed, crushed, and refined using a 1 mm diameter screen on a pilot pulper-refiner-pitter (Institut de Technologie Alimentaire, Dakar, Sénégal).

The purée obtained was homogenized, poured into 1 kg bags, and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for transport and storage.

**Clear Juice Preparation.** To obtain clear juice, the mango purée was processed as follows: (a) After dilution with distilled water (1:1, v/v) the mixture was centrifuged at 10000g for 15 min and the supernatant filtered. (b) The mango pulp homogenate was treated for 90 min at  $25^{\circ}\text{C}$  by Rohapect D5L (3.5 g/L) and cellulase (0.2 g/L) in the presence of Polyclar AT (0.2 g/L); the clear juice was obtained by two successive centrifugations at 2500g for 30 min and at 10000g for 15 min.

The pellet obtained in (a) was treated in the same way.

**Isolation of the Glycosidically Bound Fraction.** Clear juice (150 mL) was poured in a  $30 \times 2$  cm i.d. column filled with solvent-washed XAD-2 at 40 mL/min. The column was rinsed with 200 mL of distilled water, and the free volatile compounds were eluted with 300 mL of pentane. The glycosidically bound fraction was then eluted using 300 mL of methanol, and the eluate was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under vacuum at  $40^{\circ}\text{C}$ . The residue, dissolved in 2 mL of methanol, constitutes the crude glycosidically bound fraction.

**Silica Gel Chromatography.** The crude glycosidically bound fraction was separated on Chromagel 60 Å GC silica gel in a  $450 \times 15$  mm i.d. column. Elution was carried out successively with 150 mL of chloroform, 440 mL of chloroform/acetone/nitrile/32% ammonia (15:85:10, v/v), and 660 mL of the same mixture (12.5:87.5:12.5, v/v) (Salles et al., 1990). Eight milliliter fractions were collected and checked by thin layer chromatography (TLC). Fractions with the same TLC patterns were pooled to give four fractions (F1–F4), these fractions were evaporated under vacuum, and the obtained residues were dissolved in 2 mL of methanol.

**TLC.** TLC was performed with ethyl acetate/2-propanol/water (65:30:15, v/v) as eluent; saccharidic compounds were revealed using Nediac reagent (Salles et al., 1990).

**GC.** A Varian 3300 (Walnut Creek, CA) apparatus fitted with a flame ionization detector, a  $30 \text{ m} \times 25$  mm i.d. silica capillary column, DB-5 (J&W Scientific, Folsom, CA), and a Shimadzu (Kyoto, Japan) CR 3 A printer-plotter was used. The operating conditions were as follows: For the aglycon analysis, injector and detector temperatures were 250 and  $300^{\circ}\text{C}$ , respectively, and hydrogen carrier flow rate was 1.7 mL/min. The column temperature was held at  $60^{\circ}\text{C}$  for 3 min and then programmed at  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $220^{\circ}\text{C}$ . For TFA glycoside derivatives, injector and detector temperatures were 280 and  $300^{\circ}\text{C}$ , respectively, and helium carrier flow rate was 1.8 mL/min. The column temperature was raised from  $125^{\circ}\text{C}$  to  $280^{\circ}\text{C}$  at  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and held for 15 min.

Authentic samples used for identification were obtained from a commercial supply house (phenyl glucoside) or synthesized in our laboratory (benzyl, 2-phenylethyl, and  $\alpha$ -terpineyl glucosides and rutosides) (Salles et al., 1990); eugenyl, vanillyl, and furaneryl glucosides (Chassagne, 1996).  $\alpha$ -Terpineyl arabinoglucoside was received as gift.

Linear retention indices were calculated using *n*-paraffin standards (Van der Dool and Kratz, 1963).

**GC/MS.** A Varian 3400 gas chromatograph coupled to an Automass 020 (Unicam, Argenteuil, France) mass spectrometer and a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 5890 chromatograph coupled to a HP 5889A mass spectrometer were used for electron impact (EI) spectra recording. The column and the temperature program were the same as described above. Helium was used as carrier gas at 2 mL/min. The temperature of the ion source was  $160^{\circ}\text{C}$  and the ionization voltage 70 eV. The filament current was 0.376 mA, and the mass range was 35–250 scanned at 1.0 s/decade for aglycons and 60–600 scanned at 1.0 s/decade for trifluoroacetylated derivatives.

**Enzymatic Hydrolysis.** *A. niger* pectinase (0.2 mL) containing  $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -L-arabinase, and  $\alpha$ -L-rhamnosidase activities (Reyné et al., 1992), in 0.5 mL of 0.1 M

phosphate-citrate buffer (pH 5.0), were added to the residue obtained by elimination of the solvent, under a stream of nitrogen, from 0.5 mL of the crude glycosidically bound fraction. The reaction was performed in an hermetically sealed flask for 16 h at  $45^{\circ}\text{C}$ . The liberated aglycons were extracted with pentane, and the extract was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to about 0.5 mL by micro-distillation.

**Acid Hydrolysis.** Acid hydrolysis of the crude glycosidically bound fraction (0.1 mL) was performed using 2 M trifluoroacetic acid (0.04 mL) at  $120^{\circ}\text{C}$  for 1 h (Alberstein et al., 1967). After cooling, the released aglycons were extracted with pentane and the aqueous solution was analyzed by TLC and GLC after trimethylsilylation.

**Trimethylsilylation.** The method described by Sweely et al. (1963) was used: 100  $\mu\text{L}$  of the aqueous solution obtained after acid hydrolysis of the crude glycosidically bound fraction or after enzymatic hydrolysis of the F4 fraction was concentrated to dryness in a screw-capped vial at  $60^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen stream; 20  $\mu\text{L}$  of anhydrous pyridine and 20  $\mu\text{L}$  of TMS reagent were added, the vial was tightly closed, and the contents were stirred, heated at  $60^{\circ}\text{C}$  for 20 min, and then allowed to cool at room temperature.

**Trifluoroacetylation.** The crude glycosidically bound extract and the fractions recovered after silica gel separation were evaporated to dryness and treated as above using 20  $\mu\text{L}$  of anhydrous pyridine and 20  $\mu\text{L}$  of TFA reagent instead of the TMS reagent.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Silica Gel Fractionation.** The main objective of the prefractionating of the crude mango glycosidically bound extract using silica gel chromatography was to facilitate the separation and the identification of aglycons released by enzymatic hydrolysis and of derivatized glycosidic compounds. However, the TLC analysis of the four fractions (increasing polarity F1–F4) revealed, after Nediac revelation, several spots with  $R_f$  values of  $>0.5$ . This result indicates the presence of glucosides as major derivatives in the crude extract as well as in F1–F3 fractions, as previously demonstrated using synthetic glycosidically bound compounds and grape and apricot glycosidic fractions (Salles et al., 1990). The presence of glucosides is confirmed by the violet-red color that most of the spots developed after Nediac coloration. Fraction F3 would appear to contain mostly polar derivatives, diglycosides, or polyhydroxylated derivatives.  $\text{C}_{13}$  norisoprenoid glycosides have been previously reported in bound form in mango (Adedeji et al., 1992).

**Acid Hydrolysis.** TLC and GC after trimethylsilylation show that glucose (80%) is the most important carbohydrate released by acid hydrolysis of the whole crude heterosidic fraction and of the four isolated fractions. This result concurs with results obtained in the above section and with previously reported data. In particular, the significant aglycon release obtained by the action of  $\beta$ -glucosidase on mango heterosidic compounds (Adedeji et al., 1992) indicates the presence of glucosides. The significant amounts of arabinose (10%) and the trace amounts of rhamnose (1%) detected show that arabinoglucosides and rutosides are also present.

**Enzymatic Hydrolysis.** Analysis of aglycons released by enzymatic hydrolysis of the different heterosidic fractions should furnish interesting information concerning the possible nature of glycosidically bound compounds present in these fractions. However, according to the sequential enzymatic mechanism of hydrolysis and the enzyme specificity (Gunata et al., 1988) the nature of the released aglycons can be dependent of the enzyme preparation used. As indi-

**Table 1. Volatile Compounds Released by Enzymatic Hydrolysis of Glycosidically Bound Fractions Isolated from African Mango**

| compound                                      | RI (DB-5) | ID     | fraction <sup>a</sup> |
|---|-----------|--------|-----------------------|
| (Z)-hex-3-en-1-ol                             | 854       | MS, RT | C                     |
| hexanol                                       | 867       | MS, RT | C                     |
| hexanoic acid                                 | 959       | MS, RT | C                     |
| benzyl alcohol                                | 1033      | MS, RT | C, F2                 |
| furanol                                       | 1050      | MS, RT | C                     |
| (Z)-linalool furanoxide                       | 1068      | MS, RT | C, F2                 |
| (E)-linalool furanoxide                       | 1082      | MS, RT | C, F2                 |
| 2-phenylethyl alcohol                         | 1111      | MS, RT | C, F2                 |
| linalool pyranoxide                           | 1163      | MS, RT | C                     |
| $\alpha$ -terpineol                           | 1179      | MS, RT | C, F1, F2, F3         |
| benzoic acid                                  | 1191      | MS, RT | C, F1, F2, F3         |
| <i>p</i> -cymen-7-ol                          | 1278      | MS, RT | F1                    |
| 1,8- <i>p</i> -menthadien-7-ol                | 1295      | MS, RT | C                     |
| carvacrol                                     | 1297      | MS, RT | C                     |
| <i>cis</i> -6- <i>p</i> -menthen-2,8-diol     | 1324      | MS, RT | F2, F3                |
| eugenol                                       | 1353      | MS, RT | C                     |
| vanillin                                      | 1365      | MS, RT | F3                    |
| 9-hydroxymegastigma-4,7-dien-3-one            | 1372      | MS     | F3, C                 |
| <i>trans</i> -6- <i>p</i> -menthen-2,8-diol   | 1386      | MS, RT | C                     |
| 1- <i>p</i> -menthen-7,8-diol                 | 1469      | MS     | F3                    |
| 9-hydroxymegastigma-4-en-3-one                | 1668      | MS     | C                     |
| 9-hydroxymegastigma-4,6-dien-3-one (isomer 1) | 1700      | MS, RT | C, F3                 |
| 9-hydroxymegastigma-4,6-dien-3-one (isomer 2) | 1757      | MS, RT | C, F3                 |
| myristic acid                                 | 1763      | MS, RT | F1                    |
| vomifoliol                                    | 1778      | MS, RT | C, F2, F3             |
| palmitic acid                                 | 1951      | MS, RT | F1                    |
| stearic acid                                  | 2118      | MS, RT | F1                    |

<sup>a</sup> C, crude glycosidically bound fraction; F1, F2, F3, fractions isolated after silica gel separation.

cated under Materials and Methods, a pectinase preparation containing  $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -L-arabinase, and  $\alpha$ -L-rhamnosidase activities (Reyné et al., 1992) was used and the reaction was performed for a long reaction time, 16 h at 45 °C, to obtain strong hydrolysis conditions.

The volatile compounds identified by GC/MS analysis after enzymatic hydrolysis of the different mango glycosidically bound fractions are listed in Table 1. The presence of linalool oxide isomers,  $\alpha$ -terpineol, and phenolic compounds (carvacrol, vanillin, and eugenol) is consistent with previously published results (Adedeji et al., 1926; Koulibaly et al., 1992).

Linalool and geraniol identified after acid hydrolysis are not present among the compounds reported in Table 1; linalool and geraniol are probably artifacts or rearrangement products of free or bound polyols. Several polyols are reported in Table 1, and indeed several unidentified polyols have been detected by GC/MS after enzymatic hydrolysis and trimethylsilylation of the polar F4 fraction.

Menthol previously identified as free (Indstein and Schreier, 1989; Koulibaly et al., 1992) and bound compound (Koulibaly et al., 1992) was not detected after enzymatic hydrolysis of the heterosidic pool. However, several compounds having a *p*-menthane skeleton were detected, such as *p*-cymen-7-ol and carvacrol. Some of these [*cis*- and *trans*-6-*p*-menthen-2,8-diol (sobrerol)] are reported for the first time as mango aroma compounds. 1-*p*-Menthen-7,8-diol (8-hydroxyperillyl alcohol) (Figure 1) was also tentatively identified.

Detected in hydrolysates obtained from fractions F1 and F3 were 9-hydroxymegastigma-4,7-dien-3-one, 9-hydroxymegastigma-4,6-dien-3-one (two isomers), and vomifoliol, previously identified among mango (Adedeji et

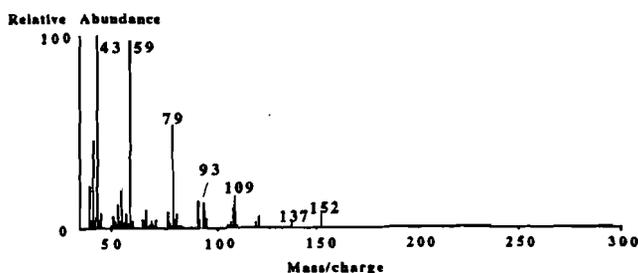
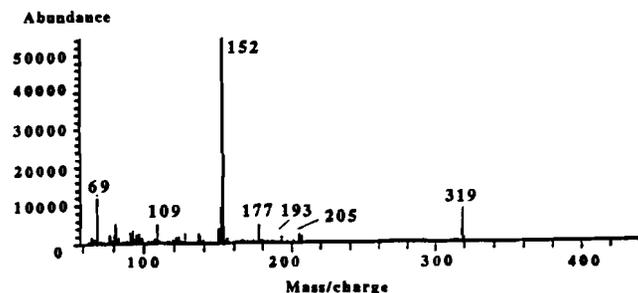
Figure 1. EI spectrum of 1-*p*-menthen-7,8-diol.

Figure 2. EI spectrum of trifluoroacetylated vanillyl glucoside.

al., 1992) and purple passion fruit (Winterhalter, 1990) bound volatiles, as well as 9-hydroxymegastigma-4-en-3-one, reported as a purple passion fruit bound C<sub>13</sub> norisoprenoid (Winterhalter, 1990).

Several acids (hexanoic, myristic, palmitic, stearic, and benzoic) were also detected in bound form in mango; palmitic acid has been previously reported (Adedeji et al. 1992). Fatty acids are presumed to play a significant metabolic role in the mango ripening; more particularly the ratio of palmitic acid to palmitoleic acid was correlated with mango aroma and flavor (Bandyopadhyay and Gholap, 1973).

Moreover, it is worth drawing attention to the identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3-(2*H*)furanone (Furanol) in bound form, since this result indicates clearly that this compound, previously identified as free component in canned mangoes (Hunter et al., 1974), is a natural product. Results of flavor threshold determination and aroma comparison studies suggest, however, that this compound does not contribute significantly to mango aroma and flavor, with the exception of mango cultivars possessing pineapple-like aroma (Wilson et al., 1990).

The chromatographic profiles obtained for the aglycons released by enzymatic hydrolysis of the glycosidically bound fractions isolated from the enzymatically liquified pellet or from the whole pulp are the same as the profile obtained from the serum resulting from pulp centrifugation.

**GC/MS Study of TFA Derivatives.** Several glycosidically bound compounds have been identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy (Williams et al., 1982; Winterhalter et al., 1991; Chassagne et al., 1996) or by MS/MS (Salles et al., 1991) after isolation of these compounds. Grape monoterpene glycoside structures have been established by a combination of enzymatic hydrolysis followed by aglycon GC/MS analysis, and direct GC/EI-MS of TMS and TFA derivatives, trifluoroacetylation gives the best results (Voinin et al., 1992a,b). According to these authors, no interference between the fragment ions resulting from the saccharidic moiety and those resulting from the aglycon moiety is observed. The EI-MS characteristic fragment ions determined by Voinin et al. (1992a,b) for TFA derivatives of  $\beta$ -D-glucopy-

Table 2. TFA Derivatives of  $\beta$ -D-Glucopyranosides Identified or Tentatively Identified in African Mango

| compound                                     | RI (DB-5) |      | EI-MS of                                     |  |
|--|-----------|------|--|--|
|  | unknown   | ref  | sugar moiety                                 | aglycon moiety   |
| furaneyl                                     | 1668      | 1672 | 319 (18), 177 (9), 193 (1), 205 (0.8)        | 128 (100), 69 (44), 85 (24), 72 (12), 148 (7), 147 (6)   |
| benzyl                                       | 1770      | 1770 | 319 (5), 193 (4), 205 (1), 265 (0.8)         | 91 (100), 92 (20), 107 (2.5), 108 (1.7)                  |
| linalyl oxide                                | 1784      |      | 319 (26), 193 (19), 205 (17), 265 (0.9)      | 111 (100), 93 (76), 69 (48), 71 (28), 153 (26), 94 (9)   |
| linalyl oxide                                | 1794      |      | 319 (32), 193 (18), 177 (3.8), 265 (1.4)     | 111 (100), 93 (78), 69 (48), 71 (29), 153 (23), 94 (9)   |
| linalyl oxide                                | 1809      |      | 319 (20), 193 (12), 177 (9), 265 (1.4)       | 111 (100), 93 (73), 69 (49), 71 (25), 153 (15), 94 (4.5) |
| linalyl oxide                                | 1814      |      | 319 (26), 177 (10), 193 (2), 265 (0.8)       | 111 (100), 93 (96), 69 (47), 71 (2), 153 (17), 94 (9)    |
| 2-phenylethyl                                | 1868      | 1856 | 319 (8.5), 193 (2.6), 177 (0.5)              | 105 (100), 104 (53), 106 (31), 91 (40)                   |
| $\alpha$ -terpineyl                          | 1946      | 1936 | 319 (38), 177 (10), 193 (9)                  | 136 (100), 81 (100), 69 (70), 93 (48), 121 (28)          |
| eugenyl                                      | 2046      | 2039 | 193 (10), 177 (5), 205 (4), 179 (3)          | 164 (100), 71 (55), 81 (25), 149 (15), 103 (13)          |
| vanillyl                                     | 2101      | 2092 | 319 (16), 177 (9), 205 (5), 193 (3)          | 152 (100), 151 (17), 153 (15), 109 (10), 81 (6)          |
| 9-hydroxymegastima-4,6-dien-3-one (isomer 1) | 2201      |      | 319 (70), 193 (6), 177 (3), 265 (2.5)        | 164 (100), 149 (67), 45 (27), 91 (26), 121(25)           |
| 9-yydroxymegastima-4,6-dien-3-one (isomer 2) | 2371      |      | 319 (66), 193(4), 177(3), 265 (0.5)          | 164 (100), 149 (52), 45 (16), 105 (8), 121 (6)           |
| vomifoliol                                   | 2319      |      | 319 (33), 193 (6), 177 (5), 205 (4), 265 (2) | 124 (100), 150 (62), 69 (37), 95 (13), 79 (10), 206 (6)  |

Table 3. TFA Derivatives of Rutinosides Identified or Tentatively Identified in African Mango

| compound            | RI (DB-5) |      | EI-MS of   |   |
|---------------------|-----------|------|--|---|
|                     | unknown   | ref  | sugar moiety   | aglycon moiety  |
| benzyl              | 2118      | 2118 | 319 (18), 205 (2), 265 (1.6) 165 (1)                       | 91 (100), 92 (69), 121 (78), 107 (11)                           |
| 2-phenylethyl       | 2201      | 2191 | 319 (10), 177 (3.7), 207 (1.4), 179 (0.5), 193 (0.5)       | 105 (100), 104 (47), 106 (24), 91 (46)                          |
| $\alpha$ -terpineyl | 2251      | 2241 | 193 (45), 319 (23), 207 (12), 205 (12), 179 (9), 265 (1.7) | 81 (100), 136 (61), 137 (35), 93 (29), 121 (28)                 |
| vomifoliol          | 2350      |      | 207 (19), 319 (7), 177 (5), 179 (4), 193 (3), 265 (1)      | 124 (100), 150 (72), 69 (28), 206 (10), 95 (9), 135 (8), 79 (7) |

Table 4. TFA Derivatives of 6-O-( $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosides Tentatively Identified in African Mango

| compound                                     | RI (DB-5) |      | EI-MS of  |   |
|--|-----------|------|---|---|
|  | unknown   | ref  | sugar moiety  | aglycon moiety  |
| 9-hydroxymegastima-4,7-dien-3-one            | 2285      |      | 319 (34), 193 (6), 165 (5), 421 (2), 265 (2)                      | 108 (100), 123 (20), 43 (14), 135 (10), 53 (7), 208 (5), 152(5) |
| $\alpha$ -terpineyl                          | 2334      | 2345 | 193 (43), 421 (8), 278 (5), 265 (2), 319 (1), 177 (1), 165 (1)    | 136 (75), 81 (57), 93 (41), 121 (34)                            |
| 9-hydroxymegastima-4,6-dien-3-one (isomer 1) | 2636      |      | 193 (50), 165 (25), 265 (18), 319 (11), 177 (9), 205 (8), 421 (3) | 164 (100), 149 (37), 121 (33), 91 (8), 45 (7)                   |
| 9-hydroxymegastima-4,6-dien-3-one (isomer 2) | 2684      |      | 193 (51), 165 (18), 319 (4), 421 (3.5), 177 (1.5), 265 (1)        | 164 (100), 45 (32), 149 (16), 91 (5), 45 (5)                    |

ranosides, 6-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosides (rutinosides), and 6-O-( $\alpha$ -L-arabinopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosides were used for the determination of mango glycosidically bound component saccharidic moiety. The characteristic fragments of the aglycon moiety, more numerous and more abundant than those obtained from the saccharidic moiety, generally enable glycosidically bound compounds to be tentatively identified.

The results concerning mango  $\beta$ -D-glucopyranosides are given Table 2. For example, fragment ions at  $m/z$  319, 177, 205, and 193 (Figure 2) are characteristic of a glucose unit and fragment ions characteristic of another saccharide are not detected. Fragment ions at  $m/z$  152, 151, 153, 109, and 81 can be attributed to vanillin. The presence of vanillyl  $\beta$ -D-glucopyranoside was confirmed using an authentic sample. Benzyl, 2-phenylethyl,  $\alpha$ -terpineyl, eugenyl, and furaneyl  $\beta$ -D-glucopyranosides were identified using the same method. Furaneyl bound as glucoside has been previously found in strawberries (Mayert et al., 1989).

Linalyl oxide  $\beta$ -D-glucopyranosides (four isomers), 9-hydroxymegastigma-4,6-dien-3-one (two isomers), and vomifoliol  $\beta$ -D-glucopyranosides were tentatively identified from their MS data. The linalyl oxide TFA derivative retention values agree with those previously published by Voirin et al. (1992b). Four linalyl oxide have been previously tentatively identified in apricot using  $\text{ND}_3$  as reagent gas in negative ion chemical ionization (Salles et al., 1991).

As indicated in Figure 3 fragment ions at  $m/z$  319, 265, 193, and 177 are characteristic of a glucose unit, fragment ions at  $m/z$  207 and 179 indicate the presence of a rhamnose unit, and fragment ions at  $m/z$  124, 150, 69, 206, 95, 135, and 79 can be attributed to a vomifoliol moiety (Winterhalter, 1990). According to these data, and the identification of vomifoliol among the compounds release after enzymatic hydrolysis of the hetro-sidic extract, the presence of vomifoliol rutinoside as mango glycosidically bound compound can be postulated. Benzyl, 2-phenylethyl, and  $\alpha$ -terpineyl rutino-

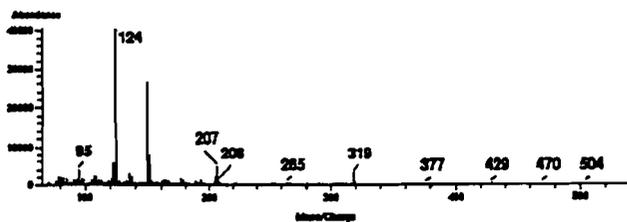


Figure 3. EI spectrum of trifluoroacetylated vomifoliol rutinoside.

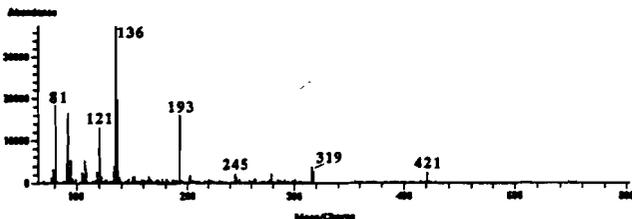


Figure 4. EI spectrum of trifluoroacetylated  $\alpha$ -terpineyl 6-O-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (tentatively identified).

sides were identified on the basis of their mass spectra and their retention indices relative to those of reference compounds (Table 3).

According to the presence of fragment ions at  $m/z$  319, 193, 177, and 265 characteristic of a glucose unit and fragment ions at  $m/z$  421, 278, and 165 characteristic of an arabinose unit, a 6-O-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside structure can be postulated from the spectral data given Figure 4. Fragment ions at  $m/z$  136, 81, 93, 69, 121, and 121 can be assigned to  $\alpha$ -terpineol. The presence of  $\alpha$ -terpineyl 6-O-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside was confirmed using an authentic sample. 9-Hydroxymegastima-4,7-dien-3-one, 9-hydroxymegastima-4,6-dien-3-one (two isomers), and 6-O-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosides were tentatively identified from their MS data (Table 4).

**Conclusion.** Ten glucosides, arabinoglucosides, and rutinosides have been identified for the first time in mango fruit using coupled GC/EI-MS; however, several compounds are still tentatively identified or unidentified according to the lack of available reference compounds. This fact underscores the limitations of the on-line analysis of glycosidically bound compounds used in the present work. The use of efficient preparative separation techniques, preparative HPLC, countercurrent chromatography, and immunoseparation is required for the isolation of labile natural compounds present in minute amounts and their identification by MS, MS/MS, and NMR. Research in this area is in progress in our laboratory.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank C. Bayonove, R. Baumes, and J. P. Lepoutre, Laboratoire des Arômes et des Substances Naturelles, INRA Montpellier, for providing reference compounds and mass spectrometer facilities.

#### LITERATURE CITED

- Adedeji, J.; Hartman, T. G.; Lech, J.; Ho, C.-T. Characterization of glycosidically bound aroma compounds in the african mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 659-661.
- Albersheim, P.; Nevins, D. J.; English, P. D.; Kan, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 1967, 5, 340-345.

- Bandyopadhyay, C.; Gholap, A. Relationship of aroma and flavour characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) to fatty acid composition. *J. Sci. Food Agric.* 1973, 24, 1497-1503.
- Chassagne, D. Doctoral Thesis, Université de Montpellier II, 1996.
- Chassagne, D.; Crouzet, J.; Bayonove, C.; Brillouet, J. M.; Baumes, R. 6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit. *Phytochemistry* 1996, 60, 1497-1500.
- Engel, K.-H.; Tressl, R. Formation of aroma components from nonvolatile precursors in passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 998-1002.
- Gunata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* 1985, 331, 83-90.
- Gunata, Z.; Bitteur, S.; Brillouet, J.-M.; Bayonove, C.; Cordonnier, R. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 1988, 184, 139-149.
- Hunter, G. L. K.; Bucek, W. E.; Radford, T. Volatile components of canned Alphonso mango. *J. Food Sci.* 1974, 39, 900-903.
- Idstein, H.; Schreier, P. Volatile constituents of Alphonso mango (*Mangifera indica*). *Phytochemistry* 1985, 24, 2313-2316.
- Koulibaly, A.; Sakho, M.; Crouzet, J. Variability of free and bound volatile terpenic compounds in mango. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1992, 25, 374-379.
- Mayert, F.; Näf, R.; Thomas, A. F. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside: isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry* 1989, 28, 631-633.
- Reyné, V.; Salles, C.; Crouzet, J. Formation of aroma by hydrolysis of glycosidically bound components. In *Food Science and Human Nutrition*; Charalambous, G., Ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1992; pp 99-114.
- Sakho, M.; Crouzet, J.; Seck, S. Volatile components of African mango. *J. Food Sci.* 1985a, 50, 548-550.
- Sakho, M.; Crouzet, J.; Seck, S. Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage (change in mango volatile components during heating). *Lebensm. Wiss. Technol.* 1985b, 18, 89-93.
- Salles, C.; Essaied, H.; Chalier, P.; Jallageas, J. C.; Crouzet, J. Evidence and characterization of glycosidically bound volatile components in fruits. In *Bioflavor '87*; Schreier, P., Ed.; de Gruyter: Berlin, 1988; pp 145-159.
- Salles, C.; Jallageas, J.-C.; Crouzet, J. Chromatographic separation and partial identification of glycosidically bound volatile components of fruit. *J. Chromatogr.* 1990, 522, 255-265.
- Salles, C.; Jallageas, J.-C.; Fournier, F.; Tabet, J.-C.; Crouzet, J. Apricot glycosidically bound volatile components. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 1979-1983.
- Schwab, W.; Mahr, C.; Schreier, P. Studies on the enzymic hydrolysis of bound aroma components from *Carica papaya* fruit. *J. Agric. Food Chem.* 1989, 37, 1009-1012.
- Stahl-Biskup, E. Monoterpene glycosides, state-of-the-art. *Flavour Fragrance J.* 1987, 2, 75-82.
- Sweeley, C.; Bentley, R.; Makita, H.; Wells, M. Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2497-2507.
- Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 1963, 11, 463-471.
- Voirin, S. G.; Baumes, R. L.; Gunata, Z. Y.; Bitteur, S. M.; Bayonove, C. L. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. I. XAD-2 extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic glycosides. *J. Chromatogr.* 1992a, 590, 313-328.
- Voirin, S. G.; Baumes, R. L.; Sapis, J.-C.; Bayonove, C. L. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II. Qualitative and quantitative determination of

- monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr.* **1992b**, *595*, 269–281.
- Williams, P. J.; Strauss, C. R.; Wilson, B.; Massy-Westropp, R. A. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* **1982**, *8*, 2013–2020.
- Wilson, C. W., III; Shaw, P. E.; Knight, R. J., Jr. Importance of some lactones and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1556–1559.
- Winterhalter, P. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 452–455.
- Winterhalter, P.; Harmsen, S.; Trani, F. A C13-norisoprenoid gentiobioside from quince fruit. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3021–3025.
- Wu, P.; Kuo, M.-C.; Hartman, T. G.; Rosen, R. T.; Ho, C.-T. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 170–172.

**Registry No. Supplied by the Author:** *n*-Pentane, 109-66-0; diethyl ether, 60-29-7; isopropanol, 67-63-0; chloroform, 67-66-3; acetonitrile, 75-03-8; methanol, 67-56-1; ethyl acetate, 141-78-6; ammonia, 1336-21-6; *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, 25561-30-2; chloromethylsilane, 75-77-4; *N*-methylbis(trifluoroacetamide), 815-06-5; Amberlite XAD 2, 9060-05-3; Polyclar AT, 25249-54-1; *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamone dihydrochloride, 1465-25-4; pectinase, 9032-75-1; cellulase, 9012-54-8; phenyl glucoside, 1464-44-4.

Received for review April 16, 1996. Revised manuscript received October 22, 1996. Accepted November 21, 1996.\*

JF960277B

---

\* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, January 15, 1997.

L'analyse des spectres de masse obtenus après injection des aglycones libérés par hydrolyse enzymatique des hétérosides, par la pectinase d'*Aspergillus niger*, a permis de mettre en évidence différents constituants :

- des alcools : aliphatiques, aromatiques, monoterpéniques ,
- des composés phénoliques ,
- des composés norisopréniques ,
- des acides gras .

L'identification des aglycones a été aisée non seulement par la comparaison des temps de rétention avec ceux de références, mais par les fragments caractéristiques que l'on a par ailleurs, retrouvés dans les spectres de masse obtenus à partir des glycosides trifluoroacétylés en impact électronique. D'autre part, l'ionisation chimique permettait de confirmer ces structures par la détermination de la masse moléculaire de l'aglycone.

Dans l'ensemble, nous notons la présence d'alcool benzylique, de 2-phényléthanol qui ont été identifiés après hydrolyse des hétérosides précurseurs d'arôme des vins, du jus de raisin (Williams et *al.*, 1982b), de quelques variétés de raisins (Williams et *al.*, 1983 ; Günata et *al.*, 1990). Schwab et Schreier (1988) ont également isolé ces composés dans la pomme, Schwab et *al.* (1989) dans la papaye, Adedeji et *al.* (1992) dans la pulpe de mangue africaine, Salles et *al.* (1990) dans l'abricot.

Nous avons des *cis* et *trans* oxydes furaniques de linalol dont la présence a été signalée également parmi les aglycones du fruit de la passion (Engel et Tressl, 1983b), de la papaye (Heidlas et *al.*, 1984), de quatre variétés de raisins : Muscat d'Alexandrie, de Frontignan, d'Hamburg et d'Ottonel (Voirin et *al.*, 1992b). Après hydrolyse acide de la fraction liée, Koulibaly et *al.* (1992) les ont révélés dans deux variétés de mangue ; puis parmi les constituants volatils libres de cinq variétés de mangue à des teneurs différentes. Salles et *al.* (1990b) ont identifiée l'oxyde furanique de linalol dans la fraction liée de l'abricot.

La vanilline, détectée pour la première fois parmi les aglycones de la mangue, a été trouvée après hydrolyse enzymatique, dans les hétérosides précurseurs d'arôme de la framboise (Pabst et *al.*, 1991), de l'ananas (Wu et *al.*, 1991). Cependant elle a été identifiée parmi les composés volatils libres du fruit de la passion, de la goyave (Shibamoto et Tang, 1990).

Les C<sub>13</sub> norisoprénoïdes ont été mis en évidence comme aglycones des hétérosides précurseurs d'arôme également dans les vins, le jus de raisin (Williams et *al.*, 1982c), la pomme (Schwab et Schreier, 1988), la papaye (Schwab et *al.*, 1989), le fruit de la passion (Winterhalter, 1990). Humpf et Schreier (1991) les ont isolés dans la fraction liée du fruit et des feuilles de mûres, Güldner et Winterhalter (1991) dans le coing, Pabst et *al.* (1991) dans la

framboise, Suárez et *al.* (1991) dans la pulpe d'une solanacée (pulpe de lulo). Les hétérosides de la tomate contiennent également ces norisoprénoïdes (Marlatt et *al.*, 1992). Tout dernièrement, l'identification de ces composés dans la pulpe de mangue que nous avons étudiée vient confirmer celle d'Adedeji et *al.* (1992) dans la pulpe de mangue africaine.

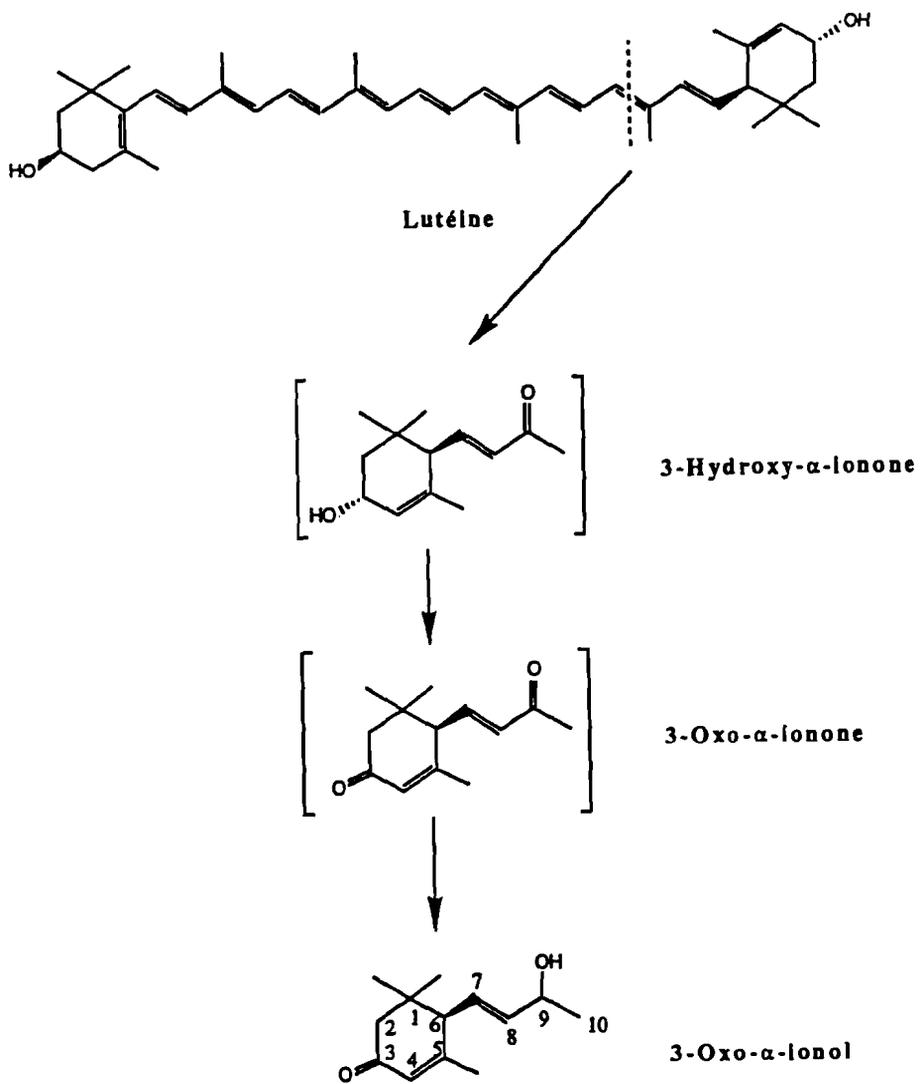
Selon Kodama (1986), ces norisoprénoïdes identifiés parmi les constituants volatils libres du tabac, seraient des produits de dégradation oxydative des caroténoïdes. Cette hypothèse a été confirmée par Razungles et *al.* (1993), Baumes et *al.* (1994) qui ont mis en évidence des liens entre la dégradation des caroténoïdes et la formation de ces norisoprénoïdes dans le raisin.

Par ailleurs de nombreuses études ont été réalisées afin d'élucider le métabolisme de formation de ces composés qui sont souvent présents aussi bien dans la fraction volatile que dans la fraction liée des composés d'arôme de végétaux. Des voies de formation de ces dérivés norisopréniques sont proposées par certains auteurs (Williams et *al.*, 1992 ; Winterhalter 1992 ; Winterhalter et Schreier, 1995 ; Winterhalter, 1997) : ces composés résulteraient du clivage enzymatique des caroténoïdes (lutéine , violaxanthine , néoxanthine...) (Fig 8 et 9). Cette biodégradation des caroténoïdes serait due à l'action de dioxygénases qui libèreraient des composés en C<sub>10</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>20</sub> (Fig 10).

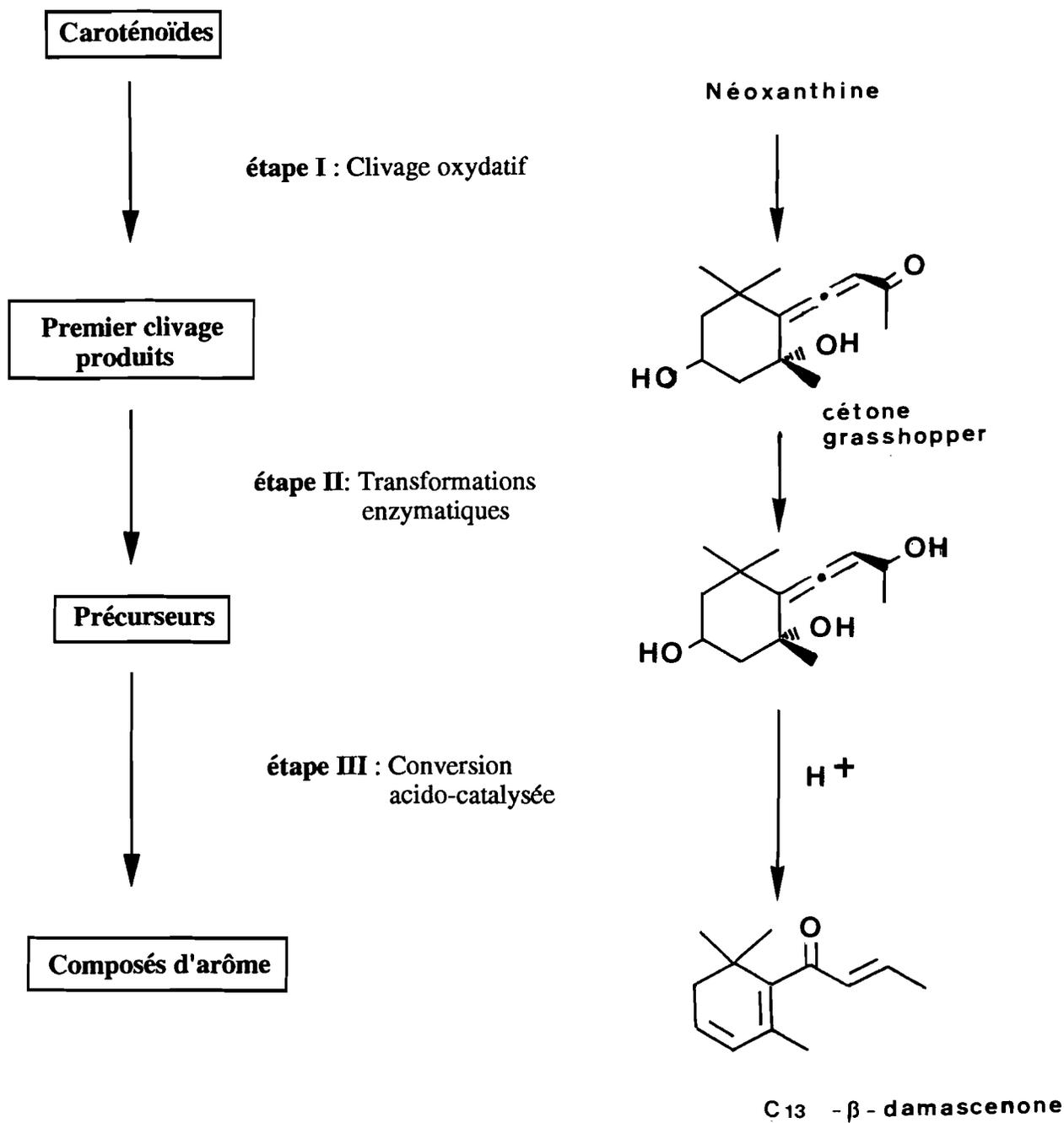
Ces composés norisopréniques en C<sub>13</sub> ont une note aromatique caractéristique et des seuils de perception olfactive très bas ( de l'ordre de 0,002 ppb dans l'eau (2 ng/l) à 20°C pour le composé C13 β-damascenone, selon Winterhalter, 1997).

L'acide benzoïque présent dans les aglycones de la pulpe de mangue, signalé également par Adedeji et *al.* (1992) a été mis en évidence dans la fraction liée d'autres fruits, notamment celle de la papaye (Schwab et *al.*, 1992), du fruit et feuilles de mûres (Humpf et Schreier, 1991), de la framboise (Pabst et *al.*, 1991). Suárez et *al.* (1991) l'ont noté dans les précurseurs d'arôme de la pulpe de lulo (solanacée), Marlatt et *al.* (1992) dans ceux de la tomate. Il faut remarquer qu'il a été identifié parmi les composés volatils libres de la papaye, du fruit de la passion et de la goyave (Shibamoto et Tang, 1990).

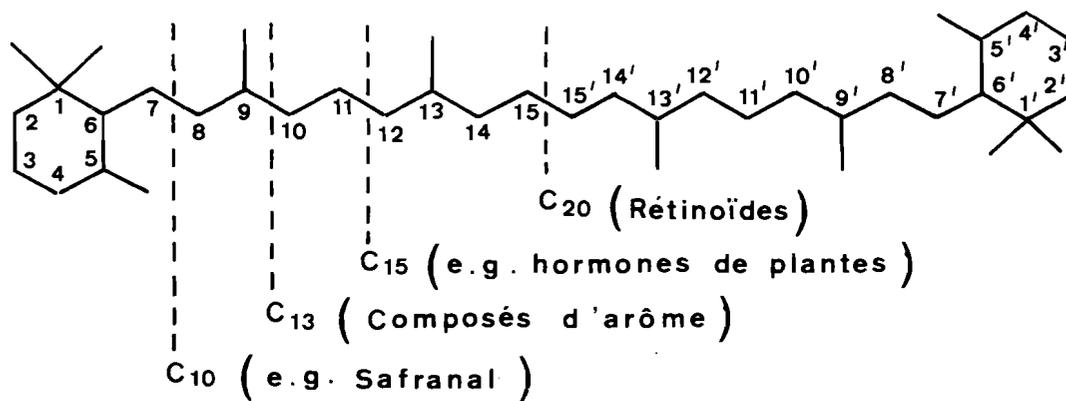
Quant aux acides gras : acide hexanoïque, myristique, palmitique et stéarique, leur présence permet de confirmer le rôle du métabolisme lipidique dans l'arôme de mangue comme l'avait indiqué Gholap et Bandyopadhyay (1980). Pour ces auteurs les acides gras en C<sub>16</sub> contribueraient à la formation des lactones au moment du mûrissement de la mangue variété « Alphonso ». En plus, après étude de deux variétés différentes, ces mêmes auteurs (1975) ont remarqué que le rapport du taux d'acide palmitique sur acide palmitoléique est en corrélation avec l'arôme et la flaveur de la mangue, et que plus le fruit mûrissait, plus le rapport devenait faible et plus la mangue était parfumée. Par ailleurs, les identifications effectuées sur les



**Figure 8 : Métabolisme probable de la dégradation de la lutéine (Adapté selon Willams *et al.* , 1992 et Winterhalter, 1992 )**



**Figure 9:** Etapes générales de la transformation des caroténoïdes en composés d'arôme (d'après Winterhalter, 1997)



**Figure 10: Fragments majeurs issus de la biodégradation de caroténoïdes par les dioxygénases ( Winterhalter, 1997 )**

constituants volatils de la mangue (Sakho et *al.*, 1985a) nous avaient permis de confirmer et de préciser les données de ces auteurs par la mise en évidence de composés liés au métabolisme lipidique, notamment les alcools à C<sub>6</sub> résultant de la dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés, des esters éthyliques d'acides gras, des acides à chaîne courte : acétique, butyrique et hexanoïque, formé par  $\beta$ -oxydation des acides à chaîne plus longue et des lactones provenant vraisemblablement du métabolisme de ces acides gras.

L'étude des aglycones après hydrolyse enzymatique, met en évidence beaucoup plus de composés que ceux mis en évidence après hydrolyse acide (Koulibaly et *al.*, 1992) et elle a permis d'identifier de nouveaux constituants libérés après hydrolyse. En outre elle nous permettra de compléter et de confirmer l'analyse des hétérosides après dérivation.

### **II-2-3 Analyse directe des glycosides par couplage CPG-SM**

Afin de confirmer les structures, nous avons soumis les hétérosides de la mangue à l'analyse spectrale directe.

Deux méthodes complémentaires basées sur le couplage CPG-SM après dérivation ont été appliquées :

- celle de Voirin et *al.*, 1992a, utilisant la spectrométrie de masse impact électronique (IE) ;
- celle de Chassagne et *al.*, 1995a, utilisant la spectrométrie de masse en ionisation chimique, mode négatif (ICN).

#### **II-2-3-1 Dérivation des hétérosides**

Les hétérosides ou fractions liées sont des composés polaires, non volatils et peu thermostables. Ainsi le but de la dérivation est de diminuer la polarité et d'augmenter la volatilité et la stabilité thermique de ces composés.

Il existe quatre méthodes de dérivation des oses et des glycosides : la méthylation, l'acétylation, la triméthylsilylation et la trifluoroacétylation.

- La méthylation, technique la plus ancienne, utilisée par Mac Innes et *al.* (1958), Hakomori (1964), Khoda et *al.* (1976) et Khonoshima et Sawada (1982, 1984), conduit à des produits secondaires et nécessite une purification préalable avant injection chromatographique.
- L'acétylation, utilisée par de nombreux auteurs : Itokawa et *al.* (1981), Huiying et *al.* (1984), Strauss et *al.* (1987, 1988), donne des composés moins volatils, moins thermostables (Williams et *al.*, 1982a) et nécessite une purification avant analyse chromatographique.

- La triméthylsilylation, utilisée pour la première fois par Sweeley *et al.* (1963) est de loin la plus pratiquée pour dériver les oses. Elle est rapide, quantitative, simple à mettre en œuvre et ne forme pas de produits secondaires pouvant interférer avec l'analyse des glycosides en chromatographie en phase gazeuse. Le mélange réactionnel peut être injecté directement sans purification préalable.
- Il en est de même pour la trifluoroacétylation qui permet, en plus des oses, la dérivation des amines, des thiols, des alcools et des acides carboxyliques grâce au N-méthyl-bis-trifluoroacétamide (MBTFA) dans de la pyridine anhydre. Elle a été utilisée avec succès par Sullivan et Schewe (1977) pour dériver les oses. Comme pour la triméthylsilylation la réaction semble complète et ne conduit pas à des composés secondaires (Voirin, 1990).

Nous retiendrons la trifluoroacétylation, car selon Voirin (1990), certains hétérosides triméthylsilylés, notamment les (R)-(S) linalyl- $\beta$ -rutosides et arabinosylglucosides présentent une stabilité limite dans les conditions chromatographiques nécessaires à une bonne résolution. En effet, cet auteur a suivi la dégradation de linalyl diglycosides triméthylsilylés analysés par couplage CPG-SM. La dégradation qui apparaît aux alentours de 250°C se traduit par une perturbation de la ligne de base, alors que l'ensemble des diglycosides est élué entre 250 et 280°C.

En plus, par rapport à la triméthylsilylation, la trifluoroacétylation présente l'avantage d'une part, d'obtenir la séparation des (R) et (S) linalyl-diglycosides dans les mêmes conditions d'analyse que celles des autres hétérosides, et d'autre part, l'identification de l'aglycone est plus aisée que dans le cas des glycosides triméthylsilylés correspondants.

En effet, les fragments provenant de l'ionisation de la partie aglycone des hétérosides trifluoroacétylés se retrouvent dans les spectres de masse des composés libres, excepté pour les glycosides de benzyle et de 2-phényléthyle.

Dans les cas des glycosides de benzyle les ions  $m/z = 91$  (pic de base) et 92, sont caractéristiques du groupement benzyl ainsi que les ions  $m/z = 107$  et 108 provenant de la fragmentation de l'aglycone, alors que le spectre de masse de l'alcool benzylique « libre » a un pic de base  $m/z = 79$ .

Quant au glycoside de 2-phényléthyle, la fragmentation de l'aglycone conduit majoritairement à l'ion  $m/z = 105$  correspondant aux groupements 2-phényléthyle et minoritairement à l'ion  $m/z = 91$  contrairement au spectre de masse du 2-phényléthanol « libre » dans lequel le pic de base est  $m/z = 91$ .

La trifluoroacétylation pourrait donc permettre une identification plus facile des aglycones des hétérosides dérivés en spectrométrie de masse à impact électronique (IE).

### II-2-3-2 Spectrométrie de masse en impact électronique des dérivés TFA

Après dérivation des glycosides, l'échantillon est injecté en couplage CPG-SM.

En impact électronique, des électrons sont émis par un filament chauffé à 200°C. On a un faisceau d'électrons de forte énergie (70 eV), ce qui engendre l'arrachement d'un électron et la production d'un radical ion ( $M+e^- \rightarrow M.^+ + 2e^-$ ), qui possède un excédent d'énergie cinétique qui va conduire à la production de fragments caractéristiques des unités constitutives de la partie osidique (Fig 11) et aglycone (Vorin et *al.*, 1992a, 1992b).

### II-2-3-3 Spectrométrie de masse en ionisation chimique (en mode négatif) des dérivés TFA

Cette méthode, contrairement à l'impact électronique, nécessite la présence d'un gaz modérateur (le méthane dans notre cas). Le gaz est ionisé par des électrons d'énergie élevée et les ions formés réagissent en phase vapeur avec les molécules étudiées par des réactions ions-molécules. Cette méthode est plus douce et donne des renseignements sur l'enchaînement des unités osidiques mais informe peu sur la partie aglycone. Par cette technique, on ne peut déduire que la masse de l'aglycone.

La comparaison des spectres de masse (tableau 8) et des indices de rétentions de composés de référence permet d'identifier les hétérosides de la mangue.

Tableau 8 : Principaux ions caractéristiques de la partie osidique des glycosides de référence trifluoroacétylés obtenus en ionisation par impact électronique et en ionisation chimique mode négatif.

| Partie osidique | Impact électronique <sup>a</sup>  | Ionisation chimique <sup>b</sup>      |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Glc p TFA       | 547, 319, 291, 265, 193, 177      | 563 <sup>c</sup> , 677, 544, 451      |
| (Rhap-Glc p)TFA | 435, 292, 207, 179, 319, 193, 177 | 901 <sup>c</sup> , 882, 789, 674, 451 |
| (Araf-Glc p)TFA | 421, 319, 278, 265, 193, 177      | 887 <sup>c</sup> , 868, 775, 660, 437 |

a : Fragmentation décrite par Voirin et *al.* (1992a)

b : Fragmentation décrite par Chassagne et *al.* (1995)

c : Ion formé par perte de la partie aglycone de nature non phénolique.

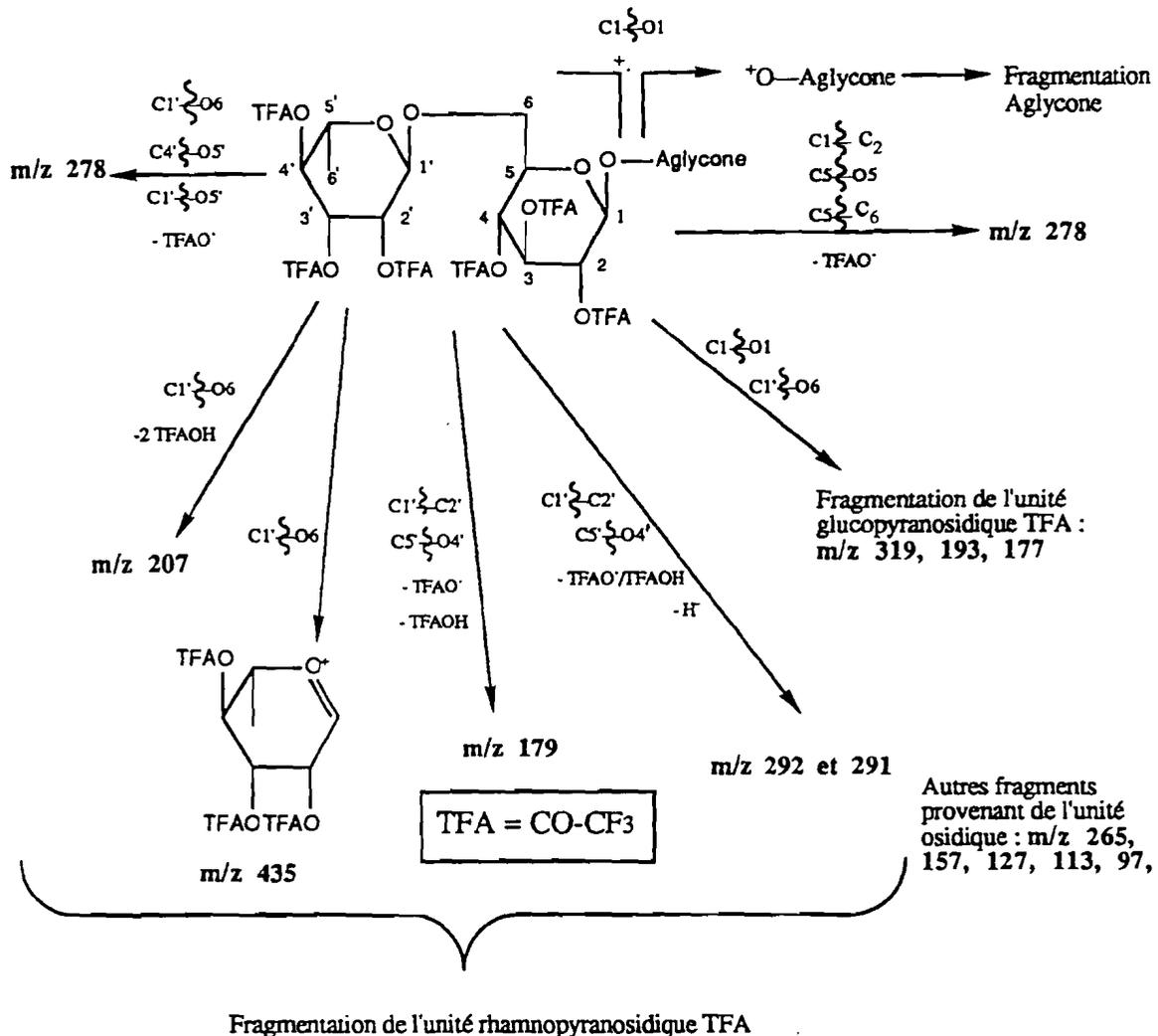


Figure 11 : Fragmentation des glycosides trifluoroacétylés en impact électronique (exemple des α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranosides TFA) (Voirin, 1990).

#### II-2-3-4 Identification des hétérosides dérivés TFA

En impact électronique les ions caractéristiques des fragments de l'unité glucopyranosyl nous ont permis d'identifier cet ose dans les dérivés trifluoroacétylés de la fraction liée, mais dans la plupart des cas nous n'avons pas observé la présence de l'ion  $m/z = 547$  du glucose trifluoroacétylé.

La partie aglycone a été identifiée à partir des pics de base et des fragments caractéristiques d'après l'étude de Voirin (1990).

Ainsi le radical benzyle a été identifié grâce à son pic de base à  $m/z = 91$  et des fragments à  $m/z = 92$  et  $107$ .

Quant aux oxydes furaniques de linalol, ils possèdent un ion majoritaire  $m/z = 111$  puis  $93$ ,  $71$ ,  $153$ ,  $94$  et ils ont été détectés

Le radical  $\alpha$ -terpinéyle a été également détecté grâce à son ion majoritaire  $m/z = 136$  et des fragments à  $m/z = 93$ ,  $121$ ,  $81$ .

Le groupement 2-phényléthyle a été mis en évidence grâce à un pic de base à  $m/z = 105$  et des fragments à  $104$  et  $91$ .

L'identification de la plupart des monoglucosides a été confirmée par comparaison de leur temps de rétention à ceux de références injectées dans les mêmes conditions.

Dans le cas du monoglucoside de furanéol, nous avons été conduits à procéder à une synthèse de ce composé.

En effet, plusieurs auteurs, pour la confirmation de la présence de précurseurs glycosidiques d'arôme, ont synthétisé des composés de référence non disponibles dans le commerce : Salles et *al.* (1990a), Voirin et *al.* (1992a, 1992b) ont identifié des glycosides de monoterpénols et d'alcools aromatiques dans le raisin après synthèse de références. Dans le fruit de la passion Chassagne (1996) a confirmé la présence de glycosides phénoliques : méthyl salicylate glucoside, eugényl glucoside et méthyl salicylate de rutinoside après synthèse de ces trois composés.

## Synthèse du glucoside de furanéol

C'est la méthode décrite par Mayerl et *al.*(1989) qui a été utilisée. Elle consiste en la condensation d'un alcool avec un ose halogéné en position anomère et convenablement protégé sur les autres positions par des groupements acétylés.

Ainsi, le composé a été synthétisé à partir de bromure de tétra-*O* -acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl et du 2,5-diméthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (le furanéol), en milieu alcalin (KOH). Une méthanolyse par le méthylate de sodium dans du méthanol, suivie d'une neutralisation permet d'avoir un mélange de deux diastéréoisomères résultant de la perte de bromure précédant l'attaque nucléophile du furanéol. Les analyses chromatographiques et spectrales de ce composé trifluoroacétylé ont permis de confirmer la présence du glucoside de furanéol, également sous ses deux formes dans l'extrait glucosidique de la mangue (tableau 9).

Tableau 9 : Spectres de masse du glucoside de furanéol trifluoroacétylé

| TRR <sup>a</sup> | Glucoside de furanéol | Ions fragments (abondance relative)                               |
|------------------|-----------------------|---|
| 1,080            | mangue, isomère 1     | 128(100)-69(22)-85(13)-319(10)-109(7)-53(7)-97(6)-177(3)-205(3)   |
| 1,097            | mangue, isomère 2     | 128(100)-69(23)-85(14)-319(8)-109(7)-53(7)-177(5)-97(3)-205(3)    |
| 1,086            | synthétisé, isomère 1 | 128(100)-69(28)-85(24)-319(13)-109(11)-97(8)-177(5)-149(5)-205(5) |
| 1,107            | synthétisé, isomère 2 | 128(100)-69(30)-85(26)-319(14)-109(10)-97(8)-177(7)-149(6)-205(4) |

a Temps de rétention relatifs obtenus par rapport au dérivé de phénylglucoside sur la colonne DB 5.

Par ailleurs, nous avons pu confirmer par des composés de référence la présence du glucoside de vomifoliol. La comparaison des ions caractéristiques des spectres de masse IE de la partie aglycone à  $m/z = 124$  et  $150$  avec ceux de la référence, en plus des fragments glucosyl, témoignent de la présence de ce glucoside dans l'extrait hétérosidique de mangue (tableau 10).

Tableau 10 : Spectres de masse des isomères du glucoside de vomifoliol trifluoroacétylé

| Aglycone                         | IR                | Fraction osidique                       | Fraction aglycone                        |
|----------------------------------|-------------------|---|--|
| Vomifoliol, isomere 1            | 2215 <sup>R</sup> | 319(12)-265(3)-193(3)-<br>205(1)        | 124(100)-150(47)-95(10)-<br>123(8)-91(2) |
| Vomifoliol, isomère 2            | 2300 <sup>R</sup> | 319(12)-193(6)-205(3)-<br>265(2)        | 124(100)-150(45)-95(9)-<br>123(10)       |
| Vomifoliol, extrait de<br>mangue | 2319              | 319(33)-193(6)-177(5)-<br>205(4)-265(2) | 124(100)-150(62)-69(37)-<br>95(13)       |

R : référence

Le glucoside de vomifoliol appelé aussi roséoside a été isolé à partir du vin de Gewürztraminer par Baltenweck-Guyot et al (1996), qui ont établi sa structure après étude spectrale RMN (Fig 12).

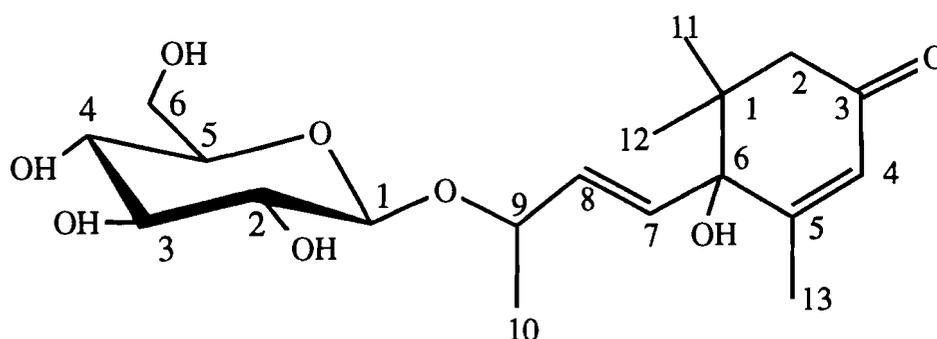


Figure 12 : Structure du glucoside de vomifoliol

Le vomifoliol a été mis en évidence dans la pomme liée à des diglycosides et même des triglycosides (Schwab et al, 1990b ; Herderich et al, 1992). Chassagne (1996) a identifié le monoglucoside de ce composé parmi les hétérosides du fruit de la passion.

En dehors des monoglucosides, nous avons détecté également la présence de rutinosides ( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranose). Dans ce cas en plus des ions caractéristiques de l'unité glucopyranosyle trifluoroacétylée, nous observons les ions  $m/z = 435$  (rare), 292, 207 et 179 spécifiques de l'unité rhamnopyranosyle trifluoroacétylée. Nous pouvons citer entre autres le vomifoliol rutinoside identifié grâce à son pic de base à  $m/z = 124$  et des fragments à  $m/z = 150, 135$  et 95.

Des  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides ont été détectés grâce aux ions caractéristiques de l'unité arabinofuranosyle trifluoroacétylée. Ce sont principalement les ions  $m/z = 421, 279, 278, 193$  et  $165$ . En plus, nous avons les ions de l'unité glucopyranosyle où l'ion  $m/z = 193$  est plus abondant que dans les spectres de masse des glucopyranosides et des  $\beta$ -rutosides trifluoroacétylés.

En bon accord avec les résultats obtenus concernant la copule glucidique, nous pouvons, sur la seule base des spectres de masse, avancer la présence d'un certain nombre d'apiosides (tableau 11) parmi les composés liés de la mangue. Les ions spécifiques de la partie osidique des apiosides TFA sont identiques à ceux de l'arabinosylglucosides trifluoroacétylé (ion  $m/z = 421, 279, 278, 193$  et  $165$ ) mais il est à noter que l'abondance relative de l'ion  $m/z = 278$  nettement supérieure (dans le cas de l'arabinosylglucoside) à celle de l'ion  $m/z = 279$ , permet de différencier les apiosylglucosides des arabinosylglucosides trifluoroacétylés (Voirin et *al.*, 1992b). Dans les spectres de masse des apiosylglucosides trifluoroacétylés, l'intensité relative de l'ion  $m/z = 278$  est toujours très faible par rapport à celle de l'ion  $m/z = 279$ . Nous avons pu ainsi distinguer les apiosides des arabinosides (Fig. 13).

Toujours sur la base des spectres de masse et compte tenu des indices de rétention élevés se situant dans la zone d'élution des diglycosides sur colonne DB5 et également sur la présence des seuls ions spécifiques du glucose, les composés détectés laissent supposer la présence de diglycosides (glucosylglucosides ou gentiobioside) (tableau 11). En effet l'ion fragment caractéristique du glucose  $m/z = 319$  est très abondant, de même que l'ion moléculaire  $m/z = 547$  du glucose trifluoroacétylé (fig 13), contrairement au cas des monoglucosides trifluoroacétylés où l'intensité de ces ions est relativement faible ou même nulle pour l'ion  $m/z = 547$ .

Ces données permettent de penser à l'existence probable des apiosides et des gentiobiosides parmi les glycosides de la mangue.

Nous avons cherché à obtenir des informations complémentaires par l'étude des spectres obtenus en IC en mode négatif.

Selon Chassagne (1996) les spectres des glycosides étudiés sont caractérisés par la présence d'un ion moléculaire ( $M$ ) et d'un ion caractéristique de la partie glucidique à partir desquels on peut déduire la masse de l'aglycone ( Fig 14 - Tableau 12). En effet, la masse moléculaire de l'aglycone est calculée en faisant la différence entre la masse du glycoside dérivé et celle de la partie osidique dérivée. Par exemple, pour un monoglucoside de benzyl trifluoroacétylé, la masse moléculaire de la forme libre de l'alcool benzylique (108) est obtenue en faisant la différence entre  $M(654)$  et  $[Glc\ p\ TFA-O](563)$  puis additionnée de 17 unités de masse correspondant à la masse du groupe hydroxyle intervenant dans la liaison glycosidique.

Tableau 11 : Identification et tentative d'identification des glycosides de la fraction totale et sous-fraction liée de la mangue en impact électronique

|   | FL<br>TFA | f(1)<br>TFA | f(2)<br>TFA | f(3)<br>TFA | IR   | IR <sub>Ref</sub> |
|---|-----------|-------------|-------------|-------------|------|-------------------|
| <b>Monoglucosides</b>                       |           |             |             |             |      |                   |
| Furanéol β-glucopyranosides (G)             | +         | -           | -           | -           | 1668 | 1672              |
| Benzyl G                                    | +         | -           | +           | +           | 1770 | 1770              |
| Linalol oxyde furanique (LOF) G             |           |             |             |             |      |                   |
| LOF-G (isomère 1)                           | +         | -           | +           | -           | 1784 |                   |
| LOF G (isomère 2)                           | +         | -           | +           | -           | 1794 |                   |
| LOF G (isomère 3)                           | +         | -           | +           | -           | 1809 |                   |
| LOF G (isomère 4)                           | +         | -           | +           | -           | 1814 |                   |
| 2-phényl éthyl G                            | -         | +           | +           | +           | 1868 | 1856              |
| Linalol oxyde pyranique G                   | -         | -           | +           | -           | 1884 |                   |
| α-Terpinéyl G                               | +         | +           | +           | +           | 1946 | 1936              |
| Eugényl G                                   | +         | -           | -           | -           | 2046 | 2039              |
| 3-Oxo 7,8-dihydro α-Ionol G                 | +         | -           | -           | -           | 2064 |                   |
| Vanilline G                                 | +         | -           | -           | -           | 2101 | 2092              |
| 3-Oxo retro α-Ionol G                       | -         | +           | -           | -           | 2201 |                   |
| Vomifoliol G                                | -         | +           | -           | -           | 2319 | 2300              |
| <b>Gentiobiosides</b>                       |           |             |             |             |      |                   |
| Benzyl G-G                                  | -         | +           | -           | -           | 1971 |                   |
| α-Terpinéyl G-G                             | +         | -           | -           | -           | 2327 |                   |
| 8-Hydroxyperillyl G-G                       | +         | +           | +           | -           | 2379 |                   |
| 3-Oxo-retro α-ionol G-G (iso 1)             | -         | -           | +           | -           | 2300 |                   |
| 3-Oxo-retro α-ionol G-G (iso 2)             | +         | +           | +           | -           | 2394 |                   |
| <b>Rutinosides</b>                          |           |             |             |             |      |                   |
| Benzyl R                                    | +         | -           | -           | -           | 2118 | 2118              |
| 2-Phényl éthyl R                            | +         | -           | -           | +           | 2201 | 2191              |
| α-Terpinéyl R                               | +         | -           | +           | -           | 2251 | 2241              |
| Vomifoliol R                                | +         | +           | +           | +           | 2350 |                   |
| <b>Arabinoglucosides</b>                    |           |             |             |             |      |                   |
| 3-Oxo-α-ionol arabinof -G                   | +         | -           | -           | -           | 2285 |                   |
| α-Terpinéyl arabinof -G                     | +         | +           | -           | -           | 2334 | 2345              |
| 3-Oxo-retro-α-ionol arabinof-G<br>isomère 1 | +         | -           | -           | -           | 2636 |                   |
| 3-Oxo-retro-α-ionol arabinof-G              | +         | -           | -           | -           | 2684 |                   |
| <b>Apioglucosides</b>                       |           |             |             |             |      |                   |
| Benzyl apiofur -G                           | -         | -           | -           | +           | 2135 |                   |
| α-Terpinéyl apiofur -G                      | +         | -           | -           | +           | 2311 |                   |
| Vomifoliol apiofur -G                       | +         | -           | -           | -           | 2632 |                   |
| 3-Oxo-retro-α-ionol apiof -G                | +         | -           | -           | -           | 2664 |                   |

IR Indice de rétention sur colonne DB5

FL Fraction liée

G Glucopyranoside

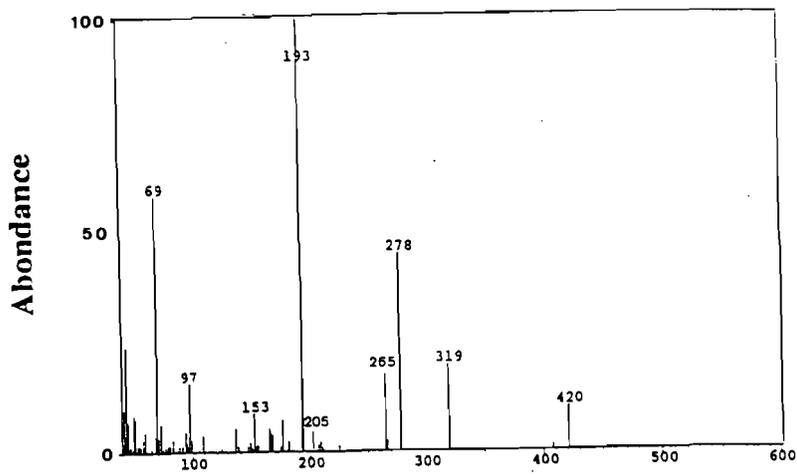
G-G Glucosyl-glucopyranoside

R Rutinosides

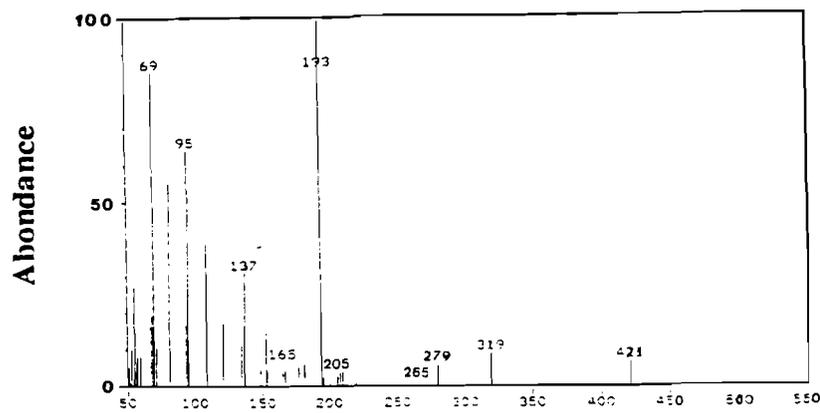
Arabinof. Arabinofuranosyl

Apiofur. Apiofuranosyl

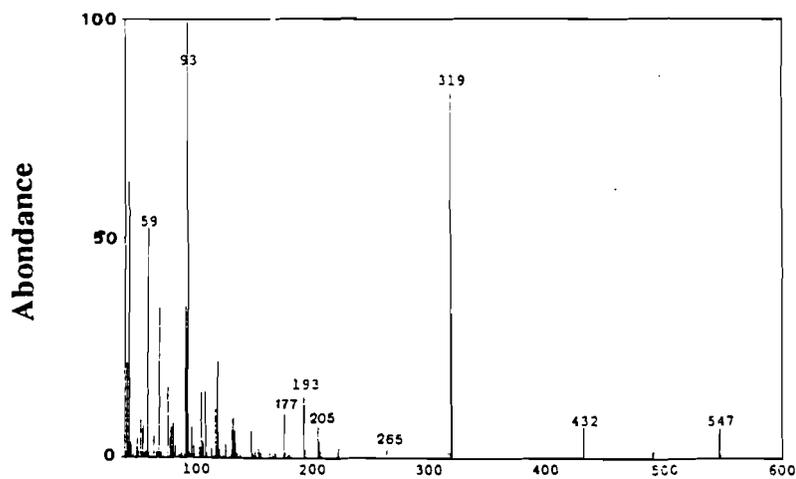
f(1) -> f(3) sous fraction liée



Spectre de masse d'un arabinofuranosyl-glucoside en ( IE )



Spectre de masse d'un apiofuranosyl-glucoside en ( IE )



Spectre de masse d'un composé supposé glucosyl-glucoside ou gentiobioside en ( IE )

Figure 13: Spectres de masse de diglycosides en impact électronique

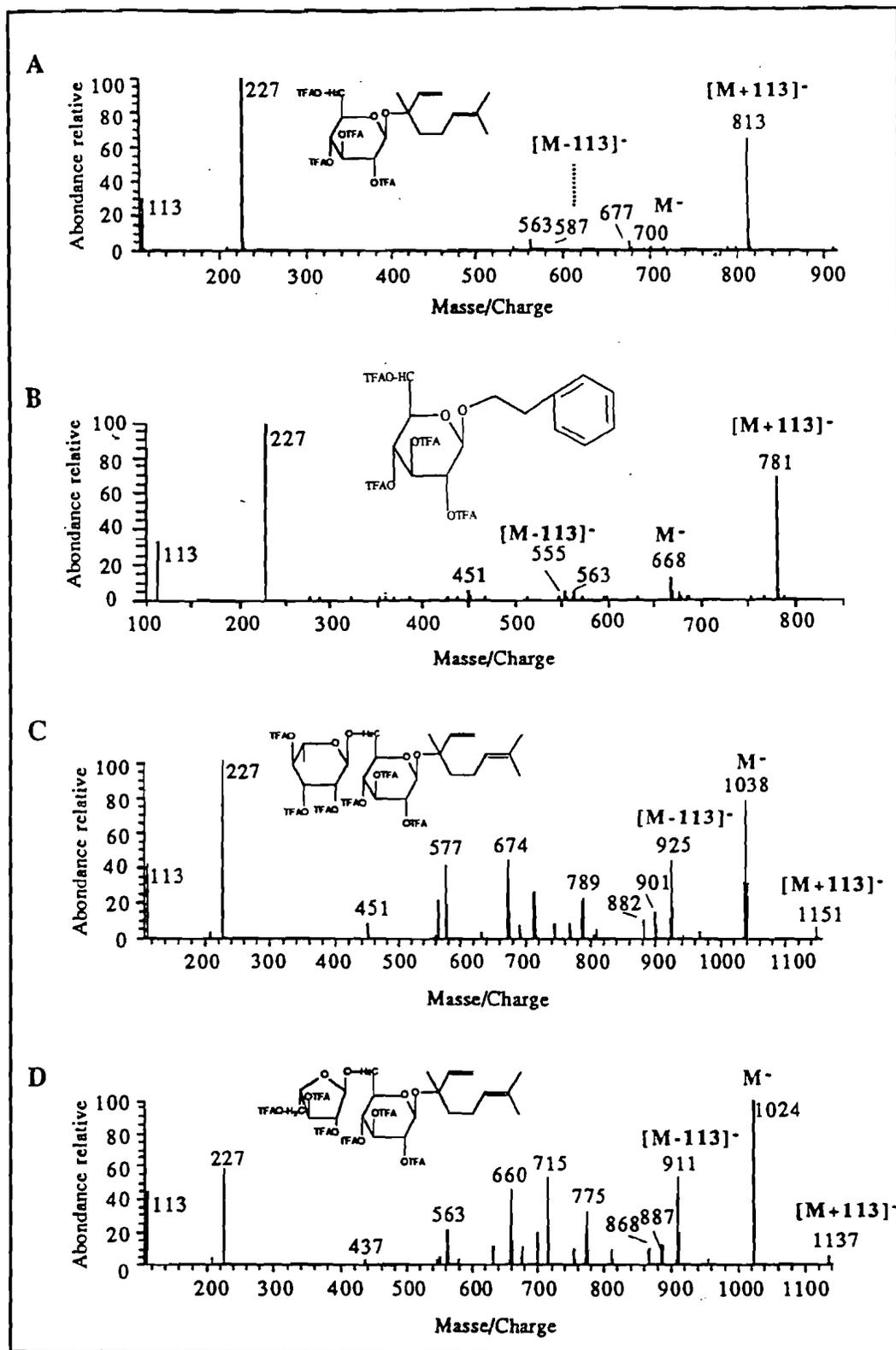


Figure 14: Spectres de masse ICN de dérivés trifluorocétylés de linalyl Glcp (A), 2-phényléthyl Glcp (B), linalyl Rhap-Glcp (C) et linalyl Araf-Glcp (D).

**Tableau 12: Interprétation des ions fragments caractéristiques des parties osidiques des dérivés trifluoroacétylés de glycosides témoins en ionisation chimique en mode négatif, (Chassagne et al., 1995 )**

| Glucoside<br>m/z Ion fragment                     | Arabinosyl ou Apiosyl glucosides<br>m/z Ion fragment        | Rutinoside<br>m/z Ion fragment                              |
|---|---|---|
| 547[Glc <sub>p</sub> TFA] <sup>-</sup>            |   |   |
| 563[Glc <sub>p</sub> TFA-O] <sup>-</sup>          | 887[(Araf-Glc <sub>p</sub> )TFA-O] <sup>-</sup>             | 901[(Rhap-Glc <sub>p</sub> )TFA-O] <sup>-</sup>             |
| 677[Glc <sub>p</sub> TFA-O+TFAOH] <sup>-</sup>    |   |   |
| 544[Glc <sub>p</sub> TFA-O-F] <sup>-</sup>        | 868[(Araf-Glc <sub>p</sub> )TFA-O-F] <sup>-</sup>           | 882[(Rhap-Glc <sub>p</sub> )TFA-O-F] <sup>-</sup>           |
| 451[Glc <sub>p</sub> TFA-O(-H+TFAO)] <sup>-</sup> | 775[(Araf-Glc <sub>p</sub> )TFA-O(-H+TFAO)] <sup>-</sup>    | 789[(Rhap-Glc <sub>p</sub> )TFA-O(-H+TFAO)] <sup>-</sup>    |
|   | 660[(Araf-Glc <sub>p</sub> )TFA-O(TFAO+TFAOH)] <sup>-</sup> | 674[(Rhap-Glc <sub>p</sub> )TFA-O(TFAO+TFAOH)] <sup>-</sup> |
|   | 437 [ArafTFA-O] <sup>-</sup>                                | 451[RhapTFA-O] <sup>-</sup>                                 |

Dans le cas d'un  $\beta$ -rutinoside de linalyle trifluoroacétylé (Fig 14, C), la masse moléculaire de la forme libre du linalol est 154, elle est obtenue également en faisant la différence entre  $M^+(1038)$  et  $[(Rhap-Glcp) TFA \sim O]^-(901)$ , puis additionnée de 17 unités de masse représentant la masse du groupement hydroxyle de la liaison glycosidique.

Ainsi l'extrait glycosidique de la mangue soumis à l'analyse spectrale par ionisation chimique en mode négative, nous a fourni un certain nombre d'informations rassemblées dans le tableau 13 ; il regroupe la masse de l'ion moléculaire, la nature et l'enchaînement des oses de la copule glucidique, la nature et la masse de l'aglycone.

Tableau 13 : glycosides de mangues détectés après ICN

| $M^+$ (glucosyl) | $M$ (aglycone) | Composés                                 |
|------------------|----------------|--|
| 654              | 108            | glucoside de benzyle                     |
| 668              | 122            | glucoside de 2-phényléthyle              |
| 698              | 152            | glucoside d'alcool monoterpénique        |
| 700              | 154            | glucoside d'alcool monoterpénique        |
| 770              | 224            | glucoside de norisoprénoïde              |
| 772              | 226            | glucoside de norisoprénoïde              |
| 978              | 108            | arabinoglucoside de benzyle              |
| 1040             | 170            | arabinoglucoside d'oxyde de linalol      |
| 1024             | 154            | arabinoglucoside d'alcool monoterpénique |
| 1022             | 152            | arabinoglucoside d'alcool monoterpénique |
| 1038             | 154            | rutinoside d'alcool monoterpénique       |

$M^+$  : ion moléculaire ;  $M$  : masse

L'ionisation chimique nous a permis de confirmer la présence des glucosides, des arabinosides, des rutinosides, mais pas des apiosides dans l'extrait glycosidique de la pulpe de mangue. En effet il convient de signaler que Chassagne et *al.* (1995) précisent qu'en ionisation chimique les 6-*O*- $\beta$ -apiofuranosyl et les 6-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinofuranosyl glucopyranosides, ne peuvent pas être distingués sur la base des abondances relatives des ions caractéristiques de la partie osidique.

L'analyse des glycosides, potentiel d'arôme inexploité, nous a conduit à entreprendre l'étude de l'effet des traitements technologiques sur la pulpe de mangue, notamment sur le profil aromatique car l'exploitation de ces composés liés par les voies de la biotechnologie pourrait aider à remédier aux modifications des constituants volatils observées lors des transformations des fruits et légumes en jus, nectars ou autres dérivés.

# CHAPITRE III

### **III Influence des traitements sur les composés volatils de la mangue**

#### **III-1 Généralités**

D'une manière générale, le succès d'un produit alimentaire, notamment des fruits et de leurs dérivés, est étroitement lié à son arôme qui est caractérisé par l'ensemble des substances volatiles directement accessibles par la muqueuse olfactive par voie directe ou par voie rétronasale. Ces substances résultent du métabolisme normal du fruit frais régulé par les gènes. Les transformations technologiques subies par le fruit en vue de préparation de jus, de pulpe, de nectar ou autres, doivent veiller à maintenir la qualité aromatique du produit transformé, plus particulièrement pour les fruits tropicaux, en l'occurrence la mangue qui grâce à sa spécificité d'arôme a un attrait pour le consommateur en quête de goût exotique.

Par ailleurs, la transformation de la mangue en pulpe, jus, nectar ou autres dérivés est une alternative à la commercialisation en fruits frais qui est limitée aussi bien par la grande fragilité du fruit que par les normes imposées par les pays importateurs. Les produits transformés pourraient également remédier aux tonnages importants perdus durant chaque période de production dans les pays en voie de développement.

#### *Préparation de jus de fruits*

En général, la préparation de jus de fruits ou de légumes, résulte de procédés mécaniques (pressage) après les traitements préliminaires de lavage et d'épluchage éventuels. Selon les cas, des opérations de tamisage, de décantation, de filtration ou d'homogénéisation interviennent avant l'entreposage ou le conditionnement.

Pour assurer une bonne conservation à moyen ou long terme, le produit subit un traitement chimique ou thermique.

#### *Traitement chimique*

Le plus souvent c'est par addition d'anhydride sulfureux, à une dose d'au moins 1 g/l, parce que la moins coûteuse. Il joue un rôle d'antiseptique et son efficacité dépend du pH acide

du milieu. Par ailleurs, l'anhydride sulfureux, même à faible concentration, protège contre le brunissement enzymatique et autres oxydations et contre le brunissement non enzymatique.

Cependant, selon Cheftel et Cheftel (1977), il présente plusieurs inconvénients, notamment au niveau de l'arôme qui subit une modification après réaction des aldéhydes et cétones présentes dans le jus, avec l'anhydride sulfureux. Et ultérieurement avec le conditionnement en boîtes de fer blanc, au contact du métal, il donne naissance à de l'hydrogène sulfuré (odeur nauséabonde). En plus la désulfitation provoque la perte de substances aromatiques volatiles.

### *Traitement thermique*

La pasteurisation est le traitement thermique le plus utilisé pour la conservation des jus de fruits. Le maintien à une température donnée pendant un temps donné, vise à tuer les microorganismes et à inactiver les enzymes qui pourraient altérer le produit ou le rendre impropre à la consommation humaine.

Cependant, ce traitement thermique engendre une modification des substances volatiles initialement présentes dans les produits non traités.

Beaucoup d'études ont été réalisées sur l'effet des traitements thermiques sur l'arôme de fruit, jus de fruits ou produits transformés. Blair *et al.* (1952) déterminent l'origine des « off-flavor » dans les jus d'agrumes après chauffage ou stockage. Kirchner *et al.* (1953) remarquent l'augmentation de la concentration en oxydes de linalol, de l' $\alpha$ -terpinéol et du furfural dans le jus de pamplemousse pasteurisé ou comme l'a souligné Chan *et al.* (1973) dans la purée de papaye après traitement thermique. Par ailleurs Seck *et al.* (1976), Sieso et Crouzet (1977), Schreier *et al.* (1977a) démontrent l'effet de la chaleur sur les constituants volatils des jus et concentrés de tomate. Schreier *et al.* (1977b) précisent l'action de la « flash pasteurisation » ou de la pasteurisation sur l'augmentation de la teneur en terpinen-4 ol,  $\alpha$ -terpinéol, carvéol et menthadiene, 2,8 ol. Des modifications sont également observées dans les fruits au sirop, les pêches (Souty et Reich, 1978), l'abricot (Rodriguez, 1978 ; Chairote, 1980).

### *Traitement enzymatique*

Depuis quelques années, de nouvelles technologies mettant en œuvre des procédés autres que mécaniques sont mis en œuvre pour la préparation des jus de fruits ou de légumes. Des procédés physiques : diffusion (Dousse et Lüthi, 1976), filtration sous vide (Cantarelli et Razzari, 1978) ou faisant appel à l'utilisation des enzymes (Rombouts et Pilnik, 1978 ; Pilnik, 1983 ; Sreenath *et al.*, 1987, 1995) sont apparus.

L'utilisation des enzymes en tant qu'aide technologique s'est largement répandue et des préparations enzymatiques commerciales sont destinées à diverses fins : clarification des jus de fruits (Pilnik et de Vos, 1970) ou des vins (Marteau, 1967), extraction des jus (Rombouts et Pilnik, 1971), stabilisation du trouble des jus d'agrumes (Baker et Bruemmer, 1972 ; Krop et Pilnik, 1974), de la pulpe de mangue (Askar et *al.*, 1990), macération et liquéfaction (Gramp, 1969 et 1972 ; Pilnik et *al.*, 1975 ; Sreenath et *al.*, 1987, 1995).

Selon Pécout et *al.* (1986), l'intérêt de ces traitements se situe au niveau des rendements élevés que l'on peut atteindre (jusqu'à 98 %), surtout de la faible importance des traitements thermiques à mettre en œuvre et de la simplicité des installations nécessaires.

L'utilisation de ces enzymes dans les fruits tropicaux est loin d'être répandue. Des études sur la liquéfaction enzymatique de quelques fruits tropicaux (goyave, papaye, mangue) ont été réalisées par plusieurs auteurs (Sreekantiah et *al.*, 1971 ; Schreier et Idstein, 1984 ; Schreier et *al.*, 1985 ; Pécout et *al.*, 1986 ; Sreenath et *al.*, 1987, 1995 ; Ollé et *al.*, 1997).

Par ailleurs, Askar et *al.* (1990) montrent que la stabilité du trouble du nectar de mangue et de goyave peut être améliorée par l'utilisation d'enzymes.

Cependant, l'influence de ces traitements enzymatiques sur le profil aromatique des fruits tropicaux a fait l'objet de très peu d'études. Dans ce domaine, Schreier et Idstein (1984) ont constaté un changement qualitatif et quantitatif au niveau des substances volatiles de la goyave et de la mangue après liquéfaction enzymatique.

### **III-2 Effet du chauffage sur les composés volatils de la mangue**

Compte tenu des modifications susceptibles d'intervenir au cours des traitements thermiques de la pulpe de mangue, nous avons étudié l'effet du chauffage sur les composés volatils de ce fruit.

Des variations de concentrations pour certaines substances, ainsi que l'apparition de nouveaux constituants sous l'action de la chaleur, sont constatées. Ces changements engendrent une modification de la perception organoleptique du produit (publication n°4 : Sakho M., Crouzet J., Seck S., 1985b - Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage - *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **18** : 89-93).

# Evolution des Composés Volatils de la Mangue au Cours du Chauffage

Mama Sakho, Jean Crouzet\* et Souleymane Seck

M. Sakho et J. Crouzet: Centre de Génie et Technologie Alimentaire, Laboratoire de Biochimie Appliquée, U.S.T.L. Place E. Bataillon, F-34060 Montpellier (France)

S. Seck: Laboratoire de Biochimie Appliquée, E.N.S.U.T. BP 5085 Dakar Sénégal  
(Reçu Mars 3, 1984; Accepté Juillet 26, 1984)

*L'évolution des composés volatils de la pulpe de mangue au cours d'un chauffage à 95°C pendant 10 minutes a été étudiée en utilisant un système clos.*

*On note des modifications importantes des pourcentages relatifs d'un certain nombre de composés: dérivés terpéniques et furanniques et composés résultant de la dégradation des caroténoïdes.*

*La pulpe chauffée est caractérisée par une augmentation du pourcentage d' $\alpha$ -terpiénol dont la formation ne peut s'expliquer uniquement par l'oxydation et le réarrangement de dérivés terpéniques (hydrocarbures, aldéhydes et alcools). On observe également une très forte dégradation de l'érémophilène. La formation des composés furanniques: furfural, acétyl-2 furane, méthyl-5 furfural et alcool furfurylique est associée à la dégradation de l'acide ascorbique qui est détruit à 50% au cours du traitement.*

*La dégradation importante observée pour le  $\beta$ -carotène (37%) permet d'expliquer la formation du dihydroactinidiolide et de la  $\beta$ -ionone dont une partie engendre la damascenone.*

*La formation de l' $\alpha$ -terpiénol, du furfural et de l'alcool furfurylique en quantités importantes est préjudiciable aux caractéristiques organoleptiques du produit.*

## Change in mango volatile components during heating

*The change of volatile components of mango pulp during heating at 95°C for 10 minutes was studied in a closed system.*

*A pronounced change of relative per cent of some volatiles: terpenic and furanic derivatives and compounds resulting from the degradation for carotenoids was observed.*

*The heated pulp is characterized by an increase of relative per cent of  $\alpha$ -terpineol, the formation of this compound cannot be explained only by oxidation and rearrangement of terpenic compounds (hydrocarbons, aldehydes and alcohols). An important degradation of eremophilene was also observed.*

*The formation of furanic compounds: furfural, 2-acetyl furan, 5-methyl furfural, furfuryl alcohol is related to the degradation of ascorbic acid who is destroyed to 50% during treatment.*

*The important degradation of  $\beta$ -carotene (37%) explains the formation of dihydroactinidiolide and  $\beta$ -ionone, part of this compound giving damascenone.*

*The increase of  $\alpha$ -terpineol, furfural and furfuryl alcohol in important quantities is detrimental for the organoleptic characteristics of the products.*

## Introduction

Les fruits tropicaux présentent du fait de leur arôme typique et inhabituel un attrait particulier pour le consommateur européen. De ce fait leur importation en dépit d'un niveau de prix élevé ne cesse de croître dans la mesure des possibilités d'approvisionnement du marché (1).

Parmi ces fruits on peut citer plus particulièrement la mangue qui avec 9,5 T par an est après la banane le deuxième fruit tropical et pour laquelle existe une ouverture du marché assez large.

Cependant la haute périssabilité de ce fruit limite considérablement sa diffusion en frais alors qu'il y a une demande

pour des produits semi-couvrés: pulpes destinées à la pâtisserie, la confiserie, l'industrie laitière et des produits transformés: jus, nectars, concentrés, arômes, fruits au sirop ou confitures.

Il est primordial que les traitements technologiques auxquels sont soumis les fruits pour conduire aux produits cités ci-dessus préservent au maximum les caractéristiques organoleptiques qui constituent leur attrait.

Dans le cas de la mangue différentes études réalisées à ce jour ont montré que les traitements thermiques avaient tendance à entraîner une perte d'arôme importante (2, 3). D'autre part certains auteurs (4) signalent la possibilité de modifications importantes de la saveur au cours du stockage des pulpes de fruits tropicaux, par suite vraisemblablement d'une inactivation insuffisante des systèmes enzymatiques.

Le but du présent travail est d'étudier quelles sont les modifications qui surviennent au niveau des composés volatils lors

\* A qui sera adressée toute correspondance.

du traitement thermique de pulpes de mangues dans des conditions qui permettent d'obtenir une inactivation des systèmes enzymatiques (5).

Nous avons utilisé pour cette étude des mangues non greffées ou mangos cultivées au Sénégal et qui sont connues comme étant plus parfumées que les mangues greffées. En dépit de leur structure fibreuse, donc de leur rendement en pulpe faible, ces mangos présentent un réel intérêt du point de vue de leur utilisation industrielle dans la mesure où de forts tonnages sont potentiellement disponibles à faible prix.

**Matériels et Méthodes**

*Matériel végétal*

Les mangos utilisés dans la présente étude proviennent de vergers situés à Pout et Sebikhotane (environ 50 km de Dakar).

Les fruits cueillis à pleine maturité ont été triés, lavés et débarrassés de leur pédoncule et la pulpe a été obtenue par broyage et raffinage à l'aide d'une pulpeuse semi-industrielle (Bertuzzi, Milan), les mailles du tamis étaient de 1 mm de diamètre. A partir de 90 kg de fruits on obtient 59 kg de pulpe qui a été conditionnée en sachets de polyéthylène et congelée à -20°C jusqu'à utilisation.

*Traitement thermique (ref. 6, 7)*

1 litre de pulpe a été chauffé dans un ballon de 3 l à 3 tubulures équipé d'un agitateur mécanique, d'un réfrigérant destiné à éviter les pertes de composés volatils et d'un thermomètre.

Le ballon est plongé dans un bain d'huile de silicone dont la température est maintenue à 100°C. Lorsque la température de la pulpe atteint 95°C (environ 20 minutes) elle est maintenue à cette température pendant 10 minutes. Le ballon est alors rapidement refroidi sous un jet d'eau jusqu'à 20°C.

*Extraction des composés volatils*

Les composés volatils ont été obtenus par entraînement à l'aide d'un évaporateur de laboratoire à flot montant opérant sous vide (8). L'extraction de 1 l de jus est poursuivie pendant 1h30 à 30°C sous 80 mn de pression. Les pièges sont refroidis successivement à l'aide d'un mélange glace-sel et d'azote liquide. Les différentes fractions recueillies ont été mélangées et extraites à l'aide de chlorure de méthylène. L'extrait organique a été séché à l'aide d'une petite quantité de sulfate de sodium anhydre et filtré et le solvant éliminé par distillation à travers une colonne de Vigreux (20 cm) à 40°C.

*Chromatographie en phase gazeuse*

Un chromatographe en phase gazeuse Varian Aerograph 2400 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire en verre de 60 m x 0.5 mm, garnie de Carbowax 20 M a été utilisée.

La température a été maintenue à 70°C pendant 10 min. et ensuite programmée à 2°C/min. jusqu'à 180°C. Le gaz vecteur était de l'azote à 7 ml/min.

Le signal de sortie a été traité à l'aide d'un intégrateur enregistreur Spectra Physics SP 4000.

*Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse*

Un spectromètre de masse LKB 2091 a été couplé avec la colonne capillaire utilisée en chromatographie analytique dans les conditions précisées ci-dessus.

Le courant d'ionisation était à 70 eV et la température de la source 230°C.

*Dosage de l'acide ascorbique*

Nous avons utilisé la méthode de ROE et OESTERLING (9) adaptée aux tissus végétaux.

*Dosage des pigments caroténoïdes (ref. 10)*

10 g de pulpe de mangue sont extraits jusqu'à l'incolore par de l'acétone refroidie (200 ml).

La solution acétonique est transvasée dans une ampoule à décanter et on ajoute 100 ml d'éther de pétrole. L'addition de quelques gouttes d'eau facilite la séparation en deux phases:

une phase supérieure: éther de pétrole contenant les chlorophylles et caroténoïdes.

une phase inférieure: phase acétonique renfermant les xanthophylles; elle est soutirée et transvasée dans une deuxième ampoule à décanter dans laquelle 50 ml d'éther de pétrole sont ajoutés. Cette fois l'hypophase est éliminée et l'épiphase mélangée à la précédente. Ce mélange étheré est lavé à l'eau distillée jusqu'à élimination complète de l'acétone.

L'extrait éthéropétrolique est saponifié par de la potasse méthanolique. L'opération se poursuit toute une nuit sous agitation à 4°C. Ceci permet l'élimination des lipides et des chlorophylles. Après repos nous avons formation de deux phases:

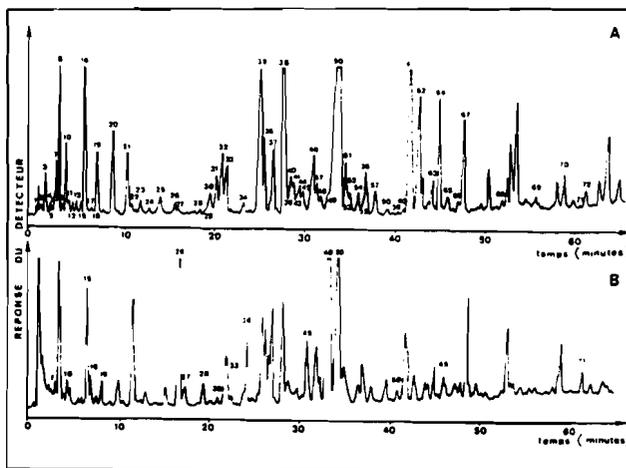
une phase éthéropétrolique, lavée à l'eau distillée, séchée sur du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis concentrée à l'évaporateur rotatif à 30°C. Cette solution contient les carotènes.

une phase méthanolique, elle est extraite avec 100 ml d'éther éthylique, puis séchée et concentrée à sec au rotavapor. Le résidu qui renferme les xanthophylles sera repris par 11 ml d'éthanol.

La détermination quantitative a été effectuée par spectrophotométrie à 450 nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2505$ ) pour les caroténoïdes et à 440 nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2580$ ) pour les xanthophylles. Les résultats sont exprimés en µg pour 100 g de pulpe.

**Résultats et Discussion**

Si on compare les chromatogrammes des composés volatils obtenus à partir de la pulpe de mangue non traitée (**Fig. 1A**) et de la pulpe de mangue traitée à 95°C pendant 10 min. (**Fig. 1B**) nous constatons que les principaux constituants identifiés dans ce type de fruits (11) et qui subissent des



**Fig. 1 A** Chromatogramme des composés volatils de la pulpe de mangue non traitée  
**B** Chromatogramme des composés volatils de la pulpe de mangue chauffée à 95°C pendant 10 min.

modifications par suite du traitement imposé sont des composés terpéniques, des dérivés furanniques et des composés tels que la damascenone, la β-ionone et le dihydroactinidolide.

Les pourcentages relatifs des principaux dérivés terpéniques présents dans la pulpe de mangue sont donnés dans le Tab. 1. Le traitement thermique se traduit par une augmentation considérable du pourcentage de l'α-terpinéol. On note également, à un degré moindre, un accroissement du Δ<sub>3</sub>-carène et du p-cymène.

L'augmentation de la teneur en α-terpinéol dans les jus de fruits ou les fruits soumis à l'action de la chaleur est un phénomène largement décrit dans la littérature (12-16). La Fig. 2 donne le schéma des réactions susceptibles de conduire à la formation de ce composé dans la pulpe de mangue compte tenu des diminutions des pourcentages de différents composés terpéniques étudiés. Cependant dans la mesure où les pertes en myrcène, limonène, β-pinène, linalol ou géraniol restent beaucoup plus faibles que l'augmentation du pourcentage d'α-terpinéol on est conduit à envisager une autre origine pour ce composé. Une voie de formation possible pourrait correspondre à l'hydrolyse en milieu acide (le pH du jus de mangue utilisé dans la présente étude est de 3,9) d'un glycoside de cet alcool. De telles formes liées ont été mises en évidence dans différents produits végétaux et récemment un glycoside d'α-terpinéol a été identifié dans le fruit de la passion (17).

La formation de quantités importantes d'α-terpinéol est sans aucun doute à l'origine de modifications notables de l'arôme du produit.

Le léger accroissement du pourcentage de Δ<sub>3</sub>-carène, peut être relié à la diminution de celui du terpinolène selon la réaction:

SOUTHWELL et ARMSTRONG (18) estiment qu'une telle réaction est susceptible de rendre compte de la présence de ces deux constituants dans l'huile essentielle du genre Zieria. Quant au p-cymène il est connu qu'il constitue le terme de la dégradation thermique de nombreux hydrocarbures terpéniques ou encore du géraniol.

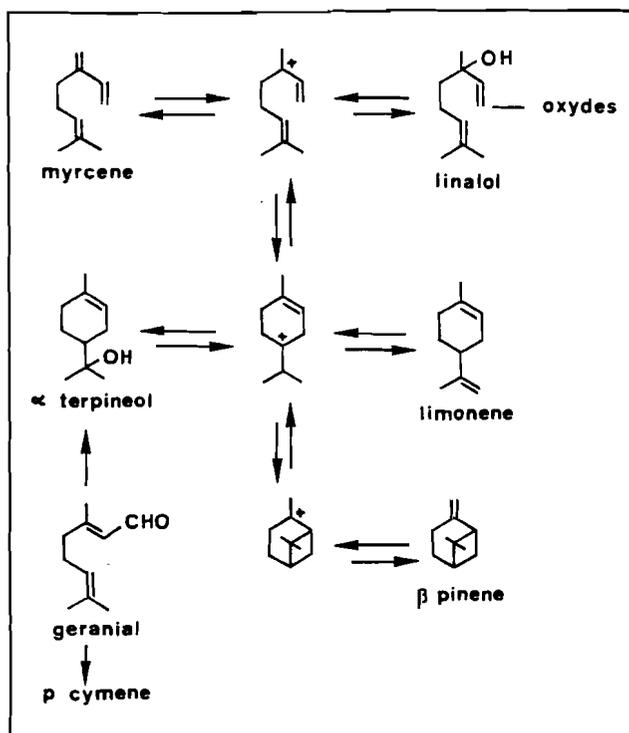


Fig. 2 Schéma des interconversions des dérivés monoterpéniques mis en évidence au cours du chauffage de la pulpe de mangue.

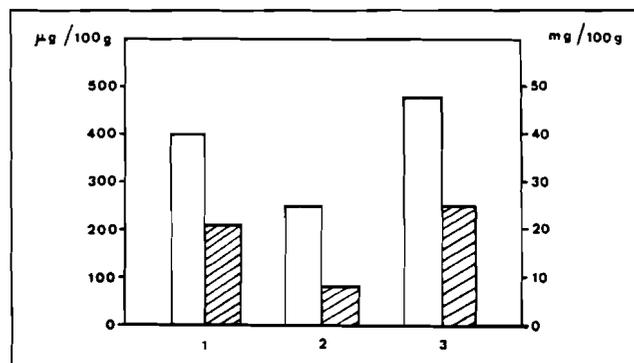


Fig. 3 Teneur en 1 = carotènes totaux (en μg/100 g) 2 = xanthophylles totales (en μg/100 g), 3 = acide ascorbique (en mg/100 g) de la pulpe de mangue non traitée = □ et traitée à 95°C pendant 10 min. = ▨

Tab. 1 Pourcentages relatifs des principaux dérivés terpéniques isolés de la pulpe de mangue non traitée et traitée à 95°C pendant 10 min

| n°<br>(fig. 1) | Composés                                     | % relatif         |               |
|----------------|--|-------------------|---------------|
|                |  | pulpe non traitée | pulpe traitée |
| 2              | α-pinene                                     | 0,1               | 0,1           |
| 4              | camphene                                     | 0,2               | 0,2           |
| 6              | β-pinene                                     | 0,1               | traces        |
| 7              | myrcene                                      | 1,2               | 0,5           |
| 8              | Δ <sub>3</sub> -carene                       | 3,6               | 4,5           |
| 10             | limonene                                     | 1,6               | 0,8           |
| 12             | cis-ocimene                                  | 0,3               | 0,1           |
| 13             | γ-terpinene                                  | 0,3               | 0,2           |
| 15             | p-cymene                                     | 0,3               | 3,7           |
| 16             | allocimene                                   | 3,5               | 0,8           |
| 19             | terpinolene                                  | 1,5               | 0,8           |
| 25             | cis oxyde de linalol<br>+ caprylate d'éthyle | 0,8               | 1,0           |
| 27             | trans oxyde de linalol                       | 0,1               | 1,1           |
| 30             | linalol                                      | 1,0               | 0,4           |
| 48             | α-terpineol                                  | 0,4               | 12,3          |
| 54             | geranial                                     | 0,7               | 0,5           |

Tab. 2 Pourcentages relatifs des principaux sesquiterpènes isolés de la pulpe de mangue non traitée et traitée à 95°C pendant 10 min

| n°<br>(fig. 1) | Composés          | % relatif         |               |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------|
|                |                   | pulpe non traitée | pulpe traitée |
| 32             | isolongifolene    | 1,2               | 1,4           |
| 33             | α-copaene         | 0,9               | 0,3           |
| 36             | α-bergamotene     | 1,4               | 1,4           |
| 37             | α-gurjunene       | 1,5               | 2,4           |
| 46             | α-humulene        | 2,6               | 2,6           |
| 50             | eremophilene      | 17,5              | 6,8           |
| 51             | alloaromadendrene | 1,6               | 1,0           |
| 57             | δ-cadinene        | 0,8               | 1,1           |
| 58             | γ-cadinene        | 0,3               | 0,8           |

**Tab.3 Pourcentages relatifs des dérivés furanniques isolés de la pulpe de mangue non traitée et traitée à 95°C pendant 10 min**

| n°<br>(fig. 1) | Composés            | % relatif         |               |
|----------------|---------------------|-------------------|---------------|
|                |                     | pulpe non traitée | pulpe traitée |
| 26             | furfural            | 0,2               | 7,7           |
| 28             | acetyl-2 furane     | 0,1               | 1,2           |
| 34             | méthyl-5 furfural   | 0,6               | 2,4           |
| 45             | alcool furfurylique | 0,6               | 2,8           |

**Tab.4 Pourcentages relatifs des composés résultant de la dégradation du  $\beta$ -carotène isolés de la pulpe de mangue non traitée et traitée à 95°C pendant 10 min**

| n°<br>(fig. 1) | Composés             | % relatif         |               |
|----------------|----------------------|-------------------|---------------|
|                |                      | pulpe non traitée | pulpe traitée |
| 60             | damascenone          | 0,1               | 0,4           |
| 65             | $\beta$ -ionone      | 0,6               | 0,8           |
| 71             | dihydroactinidiolide | traces            | 1,1           |

Signalons par ailleurs la formation lors du chauffage du jus de mangue d'oxydes de linalol (époxydihydrolinalol I et II) à partir de l'alcool. Ces composés sont également signalés par HUNTER *et al.* (20).

En ce qui concerne les sesquiterpènes, le traitement thermique induit une importante dégradation de l'érémophilène sans qu'il nous soit possible d'avancer un mécanisme.

Par ailleurs, on note une diminution du pourcentage d' $\alpha$ -copaène qu'on est tenté de relier à l'augmentation enregistrée pour le  $\gamma$ -cadinène.

Une autre cause de modification de l'arôme du produit ayant subi le traitement thermique réside dans la formation de quantités importantes de dérivés furanniques: furfural, acetyl-2 furane, méthyl-5 furfural et alcool furfurylique (Tab.3). Les trois premiers d'entre eux ont été identifiés parmi les composés volatils de la mangue (variété Alphonso) appertisée (19).

Le furfural communique au produit une odeur de cuit, quant à l'alcool furfurylique il développe une odeur désagréable, piquante.

TATUM *et al.* (20) ont montré que ces composés se formaient au cours du chauffage de solutions aqueuses d'acide ascorbique et nos résultats (21) en systèmes modèles: ose-acides aminés ou acide ascorbique-acides aminés montrent que la principale voie de formation est celle de la dégradation de l'acide ascorbique. On est en droit de penser qu'il en est de même lors du chauffage du jus de mangue pour lequel on enregistre une perte de 50% de ce composé dans les conditions opératoires utilisées (Fig.3).

On note également (Fig.4) une dégradation importante des caroténoïdes au cours du traitement: 37% de perte pour les caroténoïdes et 60% pour les xanthophylles. Or après traitement thermique des caroténoïdes et plus particulièrement du  $\beta$ -carotène, qui représente 59,5% des caroténoïdes de la mangue (22), certains auteurs ont mis en évidence la formation de  $\beta$ -ionone, de dihydroactinidiolide et d'autres composés volatils issus de la dégradation de ces pigments (23-26).

La damascenone résulterait également de la dégradation des caroténoïdes (27), cependant ce composé n'a pas été mis en évidence parmi les constituants volatils issus de la dégradation thermique du  $\beta$ -carotène.

Dans le cas de la pulpe de mangue son chauffage à 95°C pendant 10 min. entraîne une augmentation importante du pourcentage de dihydroactinidiolide et une augmentation moindre de celui de la  $\beta$ -ionone.

Dans ces conditions il est vraisemblable que l'oxydation du  $\beta$ -carotène au cours du traitement thermique conduirait à du dihydroactinidiolide et à de la  $\beta$ -ionone qui donnerait par réarrangement de la damascenone.

La présence de ces composés en très faible quantité dans le fruit frais n'est pas nécessairement liée au processus d'extraction puisque la formation de la  $\beta$ -ionone et du dihydroactinidiolide à partir du  $\beta$ -carotène peut se faire par voie photochimique (28).

Les modifications des composés volatils enregistrées au cours d'un traitement thermique propre à inhiber les systèmes enzymatiques sont donc importantes et leurs conséquences sur le plan organoleptique non négligeables. Elles mettent en évidence l'extrême thermosensibilité du produit. Par ailleurs, la perte de valeur vitaminique résultant de ce traitement est notable.

Il conviendrait donc, d'une part d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement d'off-flavor par voie enzymatique lors de la conservation et d'autre part, les traitements technologiques permettant de préserver les caractéristiques organoleptiques du fruit frais dans le but de trouver un compromis permettant de garantir un niveau de qualité satisfaisant.

## Remerciements

Les auteurs remercient Monsieur O. Kane, Directeur de l'Institut de Technologie Alimentaire de Dakar où ont été réalisées les extractions de pulpe de mangue et Monsieur Doucet pour la réalisation des couplages CPV-SM.

Une partie de ce travail a été financée par le Ministère de l'Industrie et de la Recherche (contrat no 81C1374).

## Références

- 1 NAVILLE. R., Fruits. 38. 431 (1983)
- 2 DOUGHTERY. R.M., Proc. Florida State Hort. Soc., 84. 250 (1971)
- 3 BREKKE. J.E., CAVALETTO. C.G. et STANFORD. A.E. Hawaii Agric. Exp. station. Tech. Progress Report 167 (1968)
- 4 BREKKE. J.E., CHAN. H. et CAVALETTO. C.G., J. Food Prod. Dev., 6. 36 (1972)
- 5 NANJUNDASWAMY. A.M., RADHA KRISHNAIAH SHETTY. G. et SAROJA. S., Ind. Food Packer. 30. 59 (1976)
- 6 KARLSSON-EKSTROM. G. et Von SYDOW. E., Lebensm. Wissen u. Technol., 6. 165. (1973)
- 7 SIESO. V. et CROUZET. J., Food Chem., 2. 241 (1977)
- 8 COBB. W.H., J. Food Sci., 34. 466 (1969)
- 9 ROE. J.F. et OESTERLING. M.J., J. Biol. Chem., 152. 511 (1944)
- 10 CABIBEL. M. et FERRY. P., Ann. Technol. Agric., 29. 27 (1980)
- 11 SAKHO. M., CROUZET. J. et SECK. S., J. Food Science sous presse (1984)
- 12 CHAN. H.T. Jr., FLATH. R.A., FORREY. R.R., CAVALETTO. C.G., NAKAYAMA. T.O.M. et BREKKE. J.E., J. Agric. Food Chem., 21. 566 (1973)
- 13 SCHREIER. P., DRAWERT. F., JUNKER. A. et MICK W., Z. Lebensm. Unters. Forsch., 164. 188 (1977)
- 14 SOUTY. M. et REICH. M., Ann. Technol. Agric., 27. 897 (1978)
- 15 CROUZET. J., CHAIROTE. G., RODRIGUEZ F. et SECK. S. 3rd International Flavor Conference. Instrumental analysis of foods and beverages: recent progress. Corfou, juillet 1983.
- 16 DIECKMANN R.H. et PALAMAND. S.R., J. Agric. Food Chem., 22. 498 (1974)

- 17 ENGEL, K.H. et TRESSL, R., *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 998 (1983)
- 18 SOUTHWELL, I.A. et ARMSTRONG, J.A. VIII<sup>e</sup> Congrès International des Huiles essentielles. Canne. Grasse. Annales Techniques p.323 (1982)
- 19 HUNTER, G.L.K., BUCEK, W.A. et RADFORD, T., *J. Food Sci.*, **39**, 900 (1974)
- 20 TATUM, J.H., NAGY, S. et BERRY, E.R., *J. Food Sci.*, **40**, 707 (1975)
- 21 SECK, S. et CROUZET, J., *J. Food Sci.*, **46**, 790 (1981)
- 22 JUNGALWALA, F.B. et CAMA, H.R., *Indian J. Chem.*, **1**, 36 (1963)
- 23 MURRAY, K.E., SHIPTON, J. et WHITFIELD, F.B., *Aust. J. Chem.*, **25**, 1921 (1972)
- 24 OHLOFF, G., *Flav. Indust.*, 501 (1972)
- 25 SCHREIER, P., DRAWERT, F. et BHIWAPURKAR, S., *Chem. Mikrobiol. Technol., Lebensm.*, **6**, 90 (1979)
- 26 CHAIROTE, G., RODRIGUEZ, F. et CROUZET, J., *J. Food Sci.*, **46**, 1898 (1981)
- 27 DEMOLE, F. et BERTHET, D., *Helv. Chem. Acta*, **54**, 681 (1971)
- 28 ISOE, S., YAMANISHI, T. et KOSHIRA M., *Tetrahedron Letters*, **4**, 279 (1969)

### **III-3 La macération**

La pulpe de mangue présente une viscosité très élevée, sa transformation en jus, nectar ou produits moins visqueux avec un trouble stable sans décantation, nécessite l'action d'enzymes couramment utilisés en industrie des jus de fruits et en œnologie.

Selon Voragen et Pilnik (1981), la macération consiste en une action contrôlée d'enzymes pectolytiques conduisant à la dégradation de la lamelle moyenne des tissus végétaux permettant ainsi d'obtenir une suspension de cellules intactes.

En effet, chez la plante la paroi entoure la membrane cytoplasmique de la cellule végétale. Elle constitue non seulement le squelette de la plante, mais protège les cellules des infections microbiennes et autres.

#### **III-3-1 La paroi cellulaire**

La paroi, constituée essentiellement de polysaccharides (cellulose, hemicellulose et pectines) est associée à des substances mineures (polyphénols, protéines pariétales, minéraux, pigments, lipides).

Dans cette paroi, trois parties sont distinctes :

- la lamelle moyenne, elle forme un ciment entre les différentes cellules, assurant ainsi la cohésion intercellulaire, elle est de nature pectique ;
- la paroi primaire, fine, souple, se caractérise par une forte hydrophilie, elle contient surtout des substances pectiques et des hemicelluloses qui constituent une matrice dans laquelle se noie la cellulose. Elle se présente comme une trame fibrillaire lâche ;
- la paroi secondaire, épaisse, rigide, elle apparaît à la fin de la croissance des cellules, se superposant à la paroi primaire. Elle est constituée en général d'hémicellulose et surtout de cellulose.

Voragen et *al.* (1983) ont étudié les polysaccharides de la paroi cellulaire de mangue et indiquent qu'elle est composée de 41 % de pectine, 24 % de cellulose et 9 % d'hémicellulose. Les deux dernières valeurs sont en accord avec les résultats de Ollé et *al.* (1996) sur l'étude des parois cellulaires de la pulpe de quatre variétés de mangues. Ils précisent que les glucanes hémicellulosiques sont plus abondants dans les mangues monoembryoniques ( $\cong 9$  %) que

dans les polyembryoniques ( $\cong 4\%$ ) et que les substances pectiques ont un degré d'estérification élevé (63-73 %).

Au cours de la macération, la séparation des cellules revient en pratique à la décomposition de la lamelle moyenne constituée principalement de substances pectiques.

### III-3-2 Les substances pectiques

Ce sont des hétéropolyosides, constitués essentiellement d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique et en plus faible proportion d'oses neutres tels que galactose, arabinose et rhamnose. Le xylose, le glucose, le mannose et le fucose sont moins fréquents ( Figure 15 ).

La chaîne principale est constituée d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique liée en  $\alpha(1-4)$ . Elle est interrompue de temps à autre par des unités de  $\beta$ -L-rhamnose (lié en 1-2) qui provoquent la formation de coudes, créant ainsi des zones lisses et hérissées (Figure 16).

Les acides galacturoniques peuvent être estérifiés par du méthanol sur la fonction acide en C<sub>6</sub>.

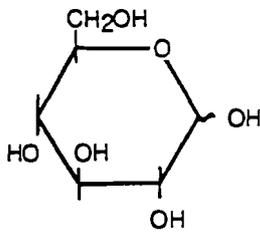
Le degré de méthylation (DM) défini comme le nombre de fonctions carboxyliques estérifiées par le méthanol pour 100 motifs galacturoniques, sert de base à la classification des pectines. Ainsi on parle :

- d'acide pectique quand le DM est inférieur à 5 % ;
- de pectines faiblement méthylées (pectine FM) si le DM est inférieur à 45-50 % ;
- de pectines hautement méthylées (pectine HM) lorsque le DM est supérieur à 50 %.

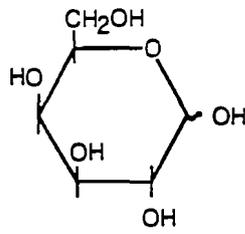
Dans la nature, les substances pectines sont le plus souvent hautement méthylées. Ainsi, d'après le tableau 13 de Voragen et *al.* (1986) les pectines de mangue ont un degré de méthylation de 68. Ce degré de méthylation dépend également des variétés (Ollé et *al.*, 1996) : 72,4 pour la variété Palmer, 72,8 (variété M'Bingue), 66,2 (variété Amélie) et 63,1 (variété Tête de Chat).

## Osés à 6 atomes de carbone

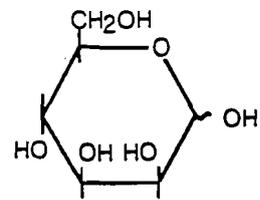
### HEXOSES



D-glucose = D-Glcp <sup>(1)</sup>

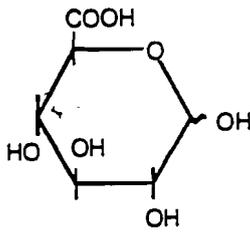


D-galactose = D-Galp

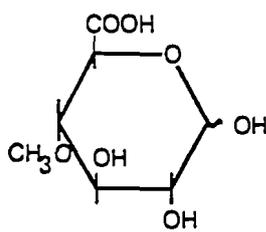


D-mannose = D-Manp

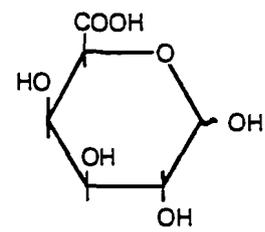
### ACIDES URONIQUES



Acide D-glucuronique  
= D-GlcAp

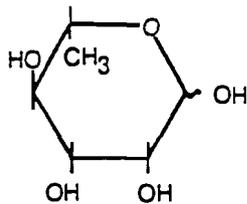


Acide 4-O-méthyle-  
D-glucuronique  
= (4-Me)-D-GlcAp

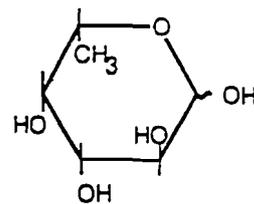


Acide D-galacturonique  
= D-GalAp

### DESOXY-6-HEXOSES

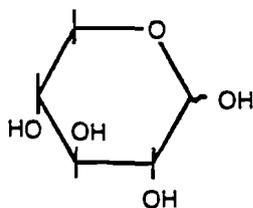


L-rhamnose = L-Rhap

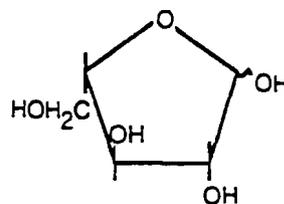


L-fucose = L-Fucp

## Osés à 5 atomes de carbone

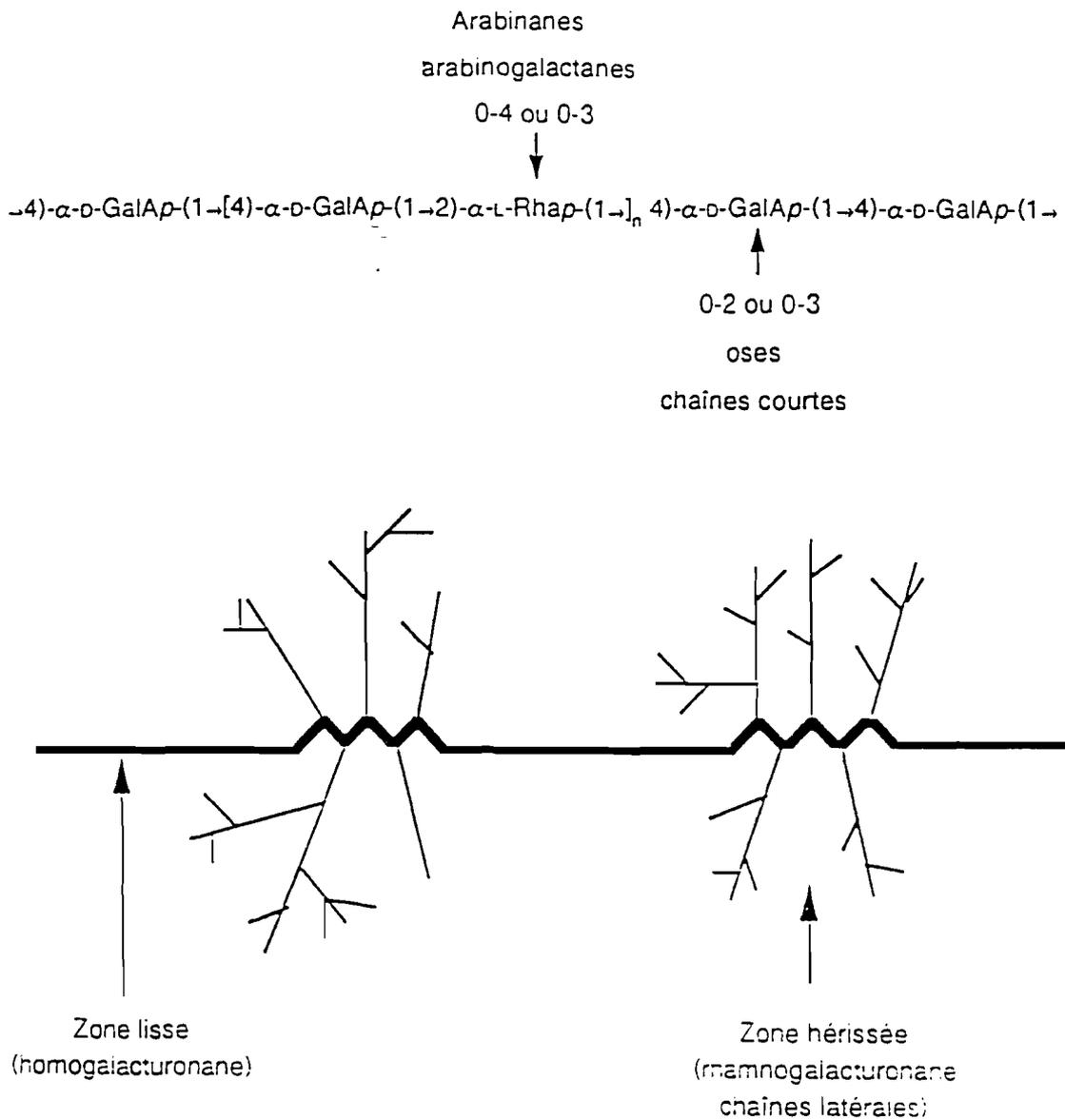


D-xylose = D-Xylp



L-arabinose = L-Araf

**Figure 15 : Osés constitutifs des polysides**  
**D-Glcp = D-glucopyranose ; D-GlcAp = Acide D-glucopyranosyluronique ;**  
**L-Araf = L-arabinofuranose.**



**Figure 16: Structure globale des pectines ( Marcelin , 1992)**

Tableau 14 : Degré de méthylation de quelques substances pectiques (Voragen et *al.*, 1986)

| Composés                  | DM |
|---------------------------|----|
| Pectine de pomme A        | 71 |
| Pectine de pomme B        | 70 |
| Pectine d'agrumes         | 64 |
| Pectine de pomme de terre | 31 |
| Pectine de mangue         | 68 |
| Pectine de poire          | 13 |
| Pectine de tournesol      | 17 |

Les substances pectiques liées aux parois cellulaires par ces chaînes latérales d'oses neutres (galactose, arabinose), constituent la protopectine.

Ces substances pectiques forment des gels en solution par conséquent elles sont responsables de la forte viscosité de la pulpe de mangue. Leur hydrolyse enzymatique conduit à une baisse de cette viscosité.

### III-3-3 Les enzymes

Trois groupes d'enzymes peuvent intervenir sur ces polysaccharides pariétaux :

- les cellulases qui dégradent la cellulose, elles sont composées d'endoglucanases, d'exoglucanases et de cellobiases ou  $\beta$ -glucosidases ;
- les hemicellulases ;
- les pectinases.

Ce dernier groupe d'enzymes est classé selon son mode d'action (tableau 15).

La macération enzymatique permet d'obtenir une suspension de cellules intactes, les enzymes utilisées sont des polygalacturonases et des pectines lyases (Figure 17), contrairement à la liquéfaction qui provoque une destruction quasi totale des structures du fruit par des cellulases combinées aux pectinases.

Ainsi, nous avons travaillé avec la pectolyase d'*Aspergillus japonicus* (Sigma) renfermant une endopolygalacturonase (EC 3.2.1.15) et une endo-pectin lyase (EC 4.2.2.10). Nous avons utilisé également quatre préparations enzymatiques industrielles : Rohament PC et Rohapect TF d'*Aspergillus niger* (Röhm) dégradant la pectine et la protopectine de même que le pectinol D5S et VR (Röhm), produites par des moisissures. Ces dernières sont susceptibles de dégrader la pectine.

**Tableau 15 : Enzymes agissant sur les substances pectiques acides et neutres d'après Baron (1990) ; Brillouet et al (1990) ; Marcelin (1992)**

| Enzyme                         | Code        | Substrat            | Produit final   | pH optimal |
|--------------------------------|-------------|---------------------|---|------------|
| Endo-polygalacturonase         | EC 3.2.1.15 |                     | monomère, dimère, trimère, acide oligo-galacturonique | 4 - 5      |
| Exo-polygalacturonase          | EC 3.2.1.67 |                     | acide galacturonique                                  | 4,5 - 5,5  |
|                                | EC 3.2.1.82 | substances          | acide digalacturonique                                |            |
| Endo-pectine-lyase             | EC 4.2.2.10 | pectiques<br>acides | acides oligo galacturoniques saturés et insaturés     | 5 - 6      |
| Endo-pectate-lyase             | EC 4.2.2.2  |                     | acides oligo galacturoniques saturés et insaturés     | 8,2 - 8,9  |
| Exo-pectate-lyase              | EC 4.2.2.9  |                     | acide digalacturonique insaturé                       | 8 - 8,5    |
| Pectine méthyl-estérase        | EC 3.1.1.11 |                     | pectates méthanol                                     | 3,5 - 4,5  |
| Pectine acétyl-estérase        |             |                     | pectates, acide acétique                              | 5          |
| Endo-arabinanases              | EC 3.2.1.99 |                     | arabinose et arabino-oligo-saccharides                | 3,5 - 7    |
|                                |             | Substances          | (monomères, dimères, trimères)                        |            |
| $\alpha$ -arabinofuranosidases | EC 3.2.1.55 | pectiques           | arabinose   |            |
| Endo-galactanases              | EC 3.2.1.89 | neutres             | galactose et galacto-oligosaccharides                 |            |
| Exo-galactanase                |             |                     | galactose   |            |

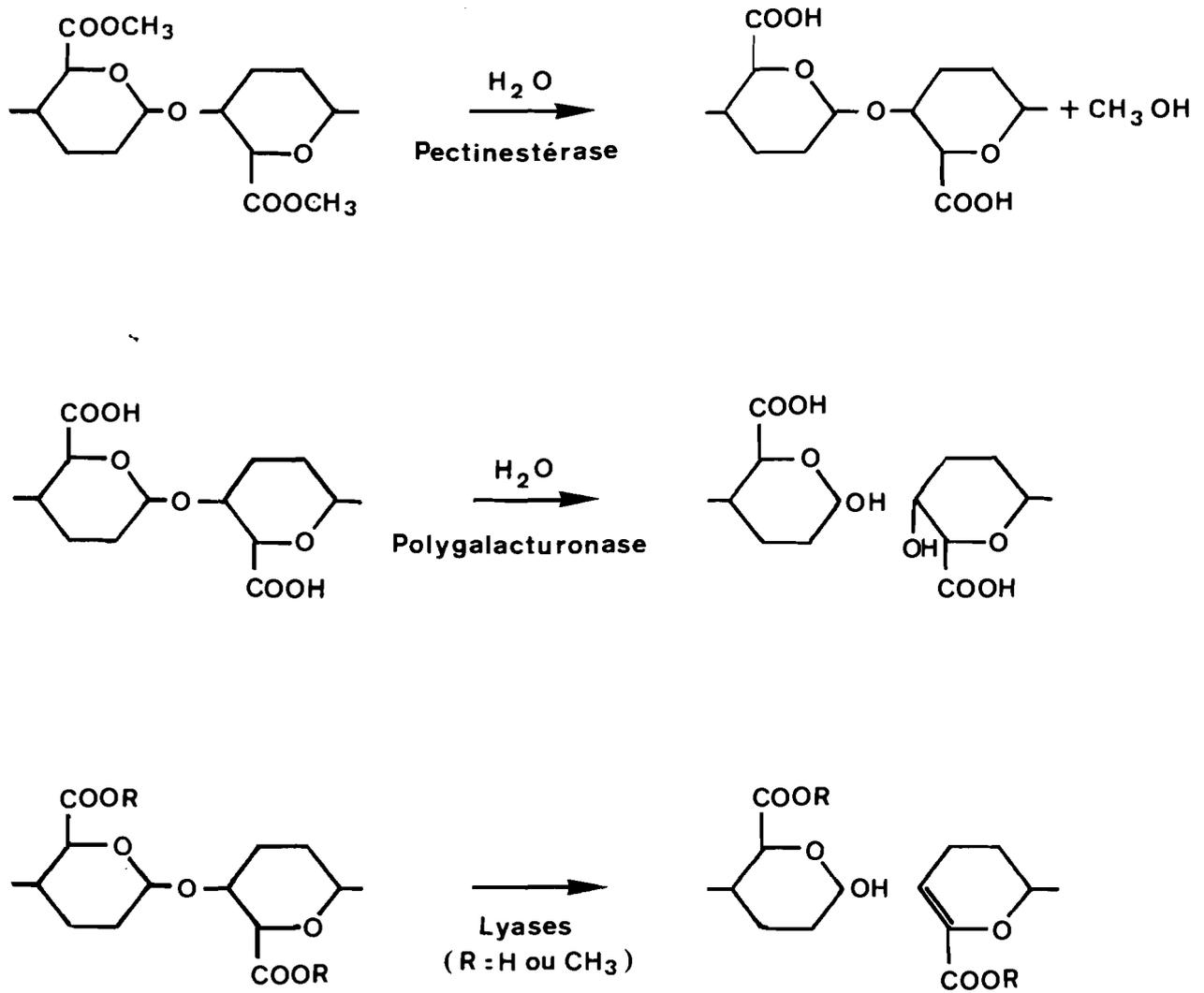


Figure 17: Mode d'action des enzymes pectolytiques

Comme il faut une dégradation partielle des pectines pour avoir une certaine viscosité résiduelle et un trouble stable, les préparations enzymatiques doivent renfermer le moins possible d'activité estérase qui entraîne la formation de précipité de pectate de calcium.

### **III-3-4 Application de la macération à la pulpe de mangue**

Cette partie a fait l'objet de la publication n°5 : Sakho M., Chassagne D., Jaus A., Chiarazzo E., Crouzet J. 1997b - Enzymatic maceration of mango pulp, Effect on the volatile components. soumis à J. Food Sci.

La macération enzymatique a été effectuée dans un réacteur en verre où la pulpe est maintenue à 50°C par une circulation d'eau chaude à travers la double paroi du réacteur.

La réaction enzymatique à 50°C dure 1 heure, et est arrêtée par une montée de la température de 50 à 80°C en 30 secondes. L'inactivation des enzymes est obtenue selon la méthode décrite par Ishii et Yokotsuka (1975).

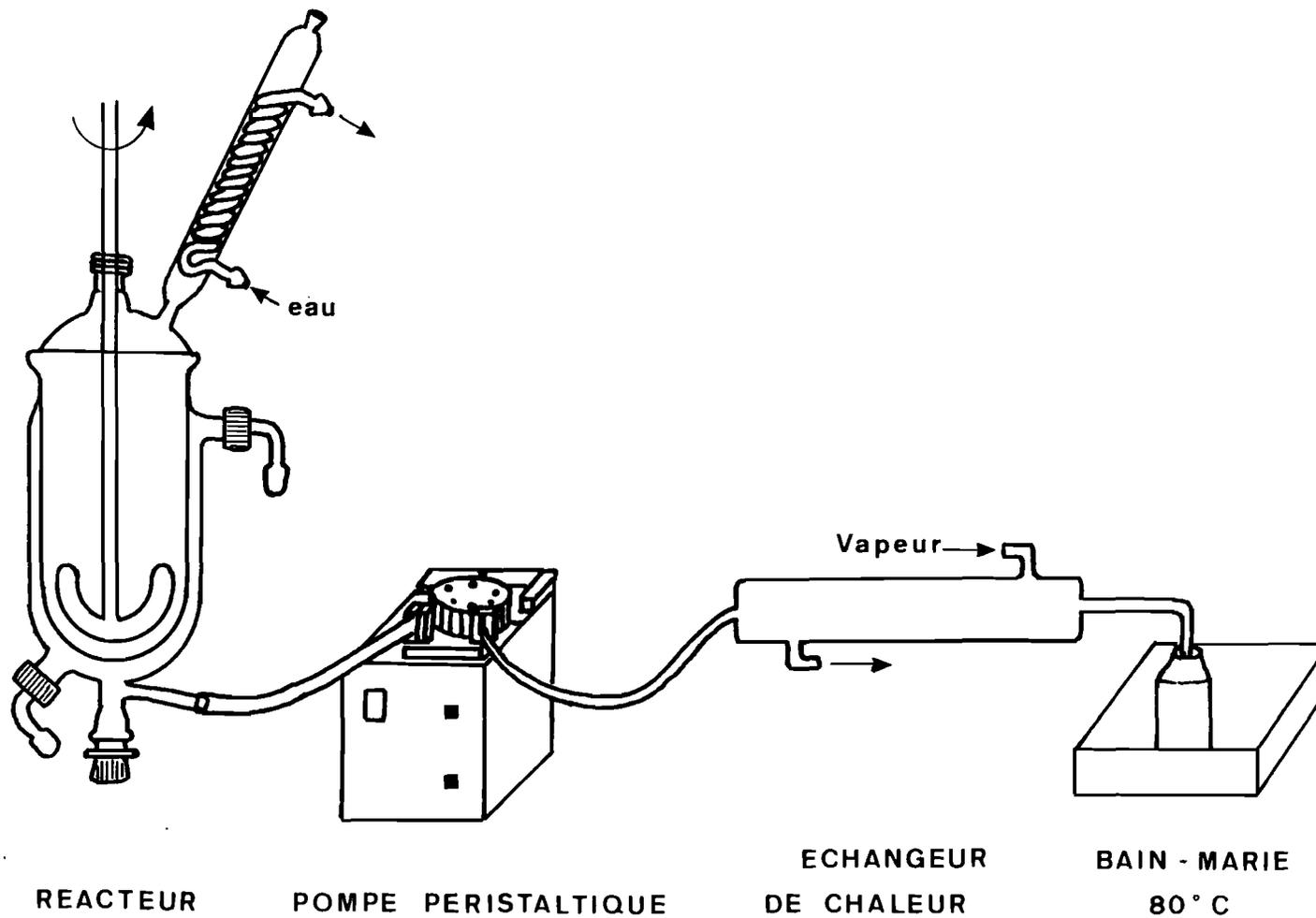
Les prélèvements pour les mesures de viscosité pour différentes enzymes et à différentes concentrations de pectolyase sont réalisés à l'aide d'une pompe péristaltique (Fig. 18). Des tests de stabilité par mesure du volume du surnageant obtenu après centrifugation ont été effectués, ainsi qu'une observation microscopique de la pulpe avant et après traitement enzymatique par la pectolyase et le Rohament PC, de même que le dosage des fibres par la méthode de Van Soest et Wine (1967).

Finalement, l'analyse chromatographique et spectrale des composés d'arôme avant et après macération par la pectolyase a permis de suivre l'évolution de ces constituants.

L'essentiel des résultats étant interprété dans la publication nous ne reprenons que le paragraphe influence du traitement enzymatique sur les substances volatiles.

#### **Effet de la macération sur les composés volatils de la pulpe de mangue**

L'identification des substances volatiles « libres » de la mangue a permis de mettre en évidence différentes classes de composés chimiques qui concourent à l'arôme de ce fruit, comme nous l'avons souligné précédemment, les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques prédominent.



**Figure 18 : Réacteur et montage utilisés pour l'étude de la macération de la pulpe de mangue**

1  
2 **Enzymatic Maceration of Mango pulp, Effect on the Volatile**  
3 **Components**  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

11 **M. Sakho<sup>1</sup> , D. Chassagne<sup>2</sup> , A. Jaus<sup>2</sup> , E. Chiarazzo<sup>2</sup> , J. Crouzet<sup>2\*</sup>**  
12

13 <sup>1</sup>Ecole Supérieure Polytechnique , B.P.5085, Dakar, Sénégal, and <sup>2</sup>Laboratoire de Génie  
14 Biologique et Sciences des Aliments, Unité de Microbiologie Industrielles Associée à l'INRA,  
15 Université de Montpellier II, 34095 Montpellier Cédex 05, France  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24 \* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail crouzet @gbsa.arpb.univ-  
25 montp2.fr)  
26  
27

28 **Abstract**

29

30 The effect of enzymatic treatment, maceration of the mango pulp with pectolyase and four  
31 commercial enzyme preparations was studied. The decrease of 50% or more of relative  
32 viscosity was obtained at different times according to enzymes excepted for Rohament PC.

33 The microscopic observations after pectolyase and Rohament PC action show a suspension  
34 of cells without destruction of cell wall, fiber remains in some cases.

35 A stability test using centrifugation indicated that the macerate was stable for a relative  
36 viscosity decrease no more greater than 50%.

37 Futhermore the concentration of monoterpene was increased after enzymatic treatment by  
38 pectolyase. Conversely the quantity of sesquiterpene decrease as well as these of fatty acid  
39 esters. Six oxygenated terpene compounds, not present in untreated mango pulp, were  
40 identified or tentatively identified : 1,8 menthadien-4-ol , p-menth-1,5-dien- 8-ol , cis-p-menth-  
41 2-en-1,8-diol , terpinen-4-ol ,  $\alpha$ -terpineol , myrtenal. It should originate from mango  
42 glycosidically bound fraction .

43

44

45 **Keywords** : Mango, enzymes, maceration, nectar, aroma.

46

47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74

## Introduction

Untill recently only processes using mechanical pressure have been used for the manufacture of fruit or vegetable juices. During the last 20 years new technologies using different physical principles, diffusion (Dousse and Lüthi, 1976), vacuum filtration (Cantarelli and Razzari, 1978) or requiring enzymes (Rombouts and Pilnik, 1978, Pilnik, 1983 ; Sreenath *et al*,1987, 1995) have appear. Pectolytic enzymes, in most cases associated to other hydrolytic activity have been used in fruit juices processing for several purposes : extraction (Rombouts and Pilnik, 1971), clarification (Pilnik and de Vos, 1970), liquefaction and maceration (Pilnik *et al*, 1975 ; Sreenath *et al*,1987, 1995), cloud stabilization (Askar *et al*, 1990).

The maceration consists in a controled action of pectolytic enzymes (Voragen and Pilnik,1981), according to the high esterification degree of pectins constituting generally the cell wall relatively to that of pectins present in the middle lamella, the use of lyases or polygalacturonases with low pectinesterase activity allows the obtention of intact cell suspensions. Conversely during liquefaction the degradation of the middle lamella is followed by the cell wall lysis under the action of pectolytic enzymes, cellulases and hemicellulases.

Reports concerning the use of pectolytic enzymes in the field of tropical fruits processing are scarce. Enzymatic liquefaction of guava, papaya and mango has been studied by several authors (Sreekantiah *et al* ,1971; Schreier *et al*, 1985 ; Pécout *et al*, 1986 ; Sreenath *et al*,1987, 1995 ; Ollé *et al*, 1997). On the other hand it was shown that cloud stability of mango or guava nectars was improved by the use of enzyme preparations containing polygalacturonase, pectin lyase, cellulases and hemicellulases (Askar *et al*, 1990). According to Schreier and Idstein (1984) qualitative and quantitative changes of tropical fruit volatile compounds occur during the liquefaction process.

75

76

77

78

79

80

81

## Materials and Methods

82

83

### Fruits

84

Ripe fruits were obtained from an orchard located at Sebikhotane, Senegal (ungrafted african mango).

85

86

87

88

89

90

91

The fruits were bleached by immersion in boiling water in order to inactivate endogenous pectolytic enzymes and polyphenol oxydase. The temperature was maintained at 60°C at heart during 5 minutes. After cooling, the fruits were peeled, destoned and crushed. The pulp obtained was carefully homogeneized, poured in polyethylene bags and frozen at -18°C until use (1 - 3 months).

92

### Enzymes

93

94

95

96

97

98

99

A pectin lyase preparation from *Aspergillus japonicus* (Sigma) containing an endo-polyacturonase (EC : 3.2.1.15) and an endo-pectin lyase (EC : 4.2.2.10) was used. In some experiment Rohament PC (Röhm Darmstadt-Germany) and Rohapect TF all from *Aspergillus niger*, special pectinase degrading pectin but also splitting protopectin were employed. Evenly Pectinol D5S (Röhm Darmstadt - Germany) and Pectinol VR from fungus enclosing pectinase activity were experimented.

100

### Enzymatic treatments

101

102

103

500 mL of thawed mango pulp were poured in a 1 liter glass reactor fitted with a stirring rod and a condenser and thermostated at  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  by circulating hot water through a jacket. The reaction started by introduction of enzymes in solution in acetate buffer 0,025 M, pH 5. 40 mL

l04 of the reactive medium were draw off at different times through a stopcok located at the botton  
l05 of the reactor.

l06 The pulp was pumped using a peristaltic pump in a steel heat exchanger heated with  
l07 steam, in these conditions the temperature was raised from 50 to 80°C in about 30 second. The  
l08 heat inactivation of the enzymes was obtained according to the results described by Ishii and  
l09 Yokotsuka (1975) holding this temperature during 10 minutes from the drawing off of the  
l10 pulp. The mixture was then rapidly cooled by iced water to 30°C.

l11  
l12 For aroma compound study , the pulp was treated with pectolyase(0,9 U /100g), 1hour at  
l13 50°C.

### l14 l15 **Viscosity measurement**

l16 A Brookefield viscosimeter Haake Rotovisco RV11 fitted with a system rotor stator MV1,  
l17 thermostated at 30°C was used. In all cases the viscosity measurements were operated after  
l18 exactly 5 minutes of rotation of the rotor. In spite of the preparation of homogenous, lot of  
l19 mango pulp variations were found concerning the initial value of mango pulp viscosity without  
l20 enzymatic treatment . In these conditions the results are expressed in relative viscosity  $[(\eta/\eta_0) \times$   
l21 100].

### l22 l23 **Stability study**

l24 The stability of products obtained after enzymatic treatment of mango pulp by pectolyase  
l25 at different concentrations during different reaction times was estimated by measurement of the  
l26 volume of supernatent obtained by centrifugation at 700 g during 3 minutes. The results are  
l27 expressed in mL per g of pulp.

### l28 l29 **Extraction of volatile compounds**

l30 The technique of Simultaneous Distillation-Extraction (SDE) (Schultz *et al*, 1977) was  
l31 used. 100g mango pulp were mixed with 150 mL phosphate buffer pH 7.0 and the volatile

132 components were isolated after 2 hours extraction, using 10 mL dichloromethane. The solvent  
133 phase was dried on sodium sulfate and concentrate to 1 mL under a smooth nitrogen flow.

#### 134 **Gas chromatography (GC)**

135 A varian 3300 gas chromatography fitted with a flame ionization detector (FID), a 30 m x  
136 0,25 mm i.d. silica Capillary Column DB5 (J & W Scientific, Folsom, CA). The injector and  
137 detector temperatures were 250°C and 300°C respectively and hydrogen carrier flow rate was  
138 1.8 mL/min. The column temperature was held 40°C for 3 min. and then programmed at  
139 2°C/min. to 250°C where it was held 15 min. Injected volumes were 1 µL of concentrated extract  
140 and 4-nonanol was used as internal standard. Linear retention indices were calculated with  
141 reference to *n* - paraffin standard (C<sub>8</sub> - C<sub>32</sub> ).  
142

#### 143 **Gas chromatography - Mass spectrometry (GC-MS)**

144 A varian 3400 gas chromatograph coupled to an Automass 020 (Unicam Argenteuil,  
145 France) mass spectrometer was used. The column and the temperature program were the same  
146 as describe above. The source temperature was 150°C, mass spectra were scanned at 70 eV for  
147 ionization voltage in the range *m/z* 35-250 uma at 1.0 s/decade.  
148

#### 149 **Fiber measurement**

150 Van Soest (1967) method was used. 5g of mango pulp with 100 mL of acid detergent (for  
151 cellulose determination) and 2 mL of decahydronaphtalene, were boiled flow back 1 hour. Then  
152 the mixture was filtered through a Büchner funnel under vacuum (glass frit n°2) (p<sub>1</sub>). The  
153 residue was washed with boiling water, then with acetone. After drying at 100°C, 8 hours, the  
154 residue (p<sub>2</sub>) was weighted after cooling.  
155

156 A second measurement with the same weight of mango pulp, 2 mL of  
157 decahydronaphtalene but with 100 mL of neutral detergent (for determination of cellulose and  
158 hemicellulose) and 0.5 g of NaSO<sub>3</sub> was effected. The follow is same above.  
159

160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187

$$\text{Percent fibre (pulp fresh weight)} = \frac{P_2 - P_1}{m} \times 100 \quad m = 5g$$

### Microscope

Optical microscope LEICA Galen III was used. One drop of mango pulp was observed after coloration with red Congo at magnifying 100.

## Results and Discussion

### Effect of enzyme concentrations

This work was made using the pectolyase preparation, six enzyme concentrations from 0.30 to 1.54 U/100 g of mango pulp were used according to the optimization data obtained by Pécout *et al*, 1986. The temperature was regulated at 50°C .

The results reported Fig. 1, indicate that the decrease of the relative viscosity is improved when the enzyme concentration is varied from 0.30 to 0.90 U/100 g. Beyond this concentration no increase is noticed. The maximum viscosity decrease is limited to 75%, these results are in agreement with previously reported data for the reduction of viscosity obtained during enzymatic liquefaction of mango pulp (Sreenath *et al*,1987,1995; Ollé,1997). These authors indicate a decrease of viscosity varying for 40 to 90%. It can be assumed that all the compounds able to used as enzyme substrat have been degraded.

### Effect of different enzymes

The maceration of mango pulp was performed using several enzymatic preparations: pectolyase (Sigma) and four commercial preparations (Rohament PC, Pectinol VR and D5S and Rohapect TF). For the industrial enzymes the concentration used were determined for the technical information given by the producers. The temperature was 50°C for all the preparation.

188 A decrease of the relative viscosity of 50% was obtained after 12.6 min. with pectolyase  
189 (0.90 U/100g), after 16.5 min. with Rohapect TF (9.5 mg/100g), after 17.5 min. with Pectinol  
190 D5S (9.5 mg/100g) and after 20 min. with Pectinol VR (10.5 mg/100g). For Rohament PC, a  
191 decrease of the relative viscosity of only 25 % was noticed after 16 min. with an enzyme  
192 concentration (15 mg/100g) more important than those used for the other preparations (Fig. 2).  
193 These results by viscosity measurement indicated that excepted Rohament PC, all the  
194 preparation tested can be used for mango pulp maceration.

### 195 196 **Microscopic observations**

197 The examination of mango tissue by optical microscopy was performed before and after  
198 enzymatic treatment (Fig. 3).

199 The cells aggregate observable after coloration of the pulp using red Congo (3a),  
200 disappear after enzymatic treatment using pectolyase (3b) but also Rohament PC (3c), a cell  
201 suspension, without cell-wall destruction is observed after these treatment. Although only a  
202 viscosity decrease of about 25 % was obtained when Rohament PC preparation was used for  
203 maceration, the microscopic examination of the hydrolysate indicate clearly that the pectins  
204 present in the middle lamella have been destroyed. However fibers, probably of ligno-cellulosic  
205 nature (Ollé, 1997), are distinguishable in some cases (Fig. 3d).

206 In order to have an idea of the nature of component responsible of the residual viscosity  
207 before treatment and after action of pectolyase and Rohament PC, a determination of the cell  
208 wall material using the Van Soest method was made (Table 1).

209 These results show that no consequent attack of cellulose occurs during the enzyme  
210 treatment, in the contrary the decrease of the cell wall material extractible by the neutral detergent  
211 indicates that hemicelluloses are slightly degraded under the enzyme action. So it can be  
212 assumed that the two enzyme preparations used contain an hemicellulase, however none  
213 degradation of cell wall was detected by microscopic examination.

### 214 215 **Stability tests**

216 The stability of cell suspensions obtained after enzymatic treatment was checked by the  
217 measure of the supernatant volume obtained after centrifugation at 700 g during 3 minutes. In  
218 these conditions the untreated pulp was characterized by the absence of a supernatant phase. The  
219 results obtained for several reaction times and several enzyme quantities are given Fig. 4.

220  
221 The decantation easiness corresponding to the product instability is related to the viscosity  
222 decrease excepted in the first reaction stages where the separation is less fast than the viscosity  
223 decrease, more particularly for the low enzyme quantities.

224 When the viscosity decrease is more than 50 % synaeresis occurs so that a 50 % viscosity  
225 decrease must be searched.

### 226 227 **Influence of the enzymatic treatment upon the volatile fraction**

228 The modification of aroma compound concentration occuring during the maceration  
229 treatment of mango pulp by the pectolyase preparation are given Table 2.

230 The most important modification is the increase of monoterpene concentration excepted  
231 for  $\beta$ -phellandrene.

232 This increase can be explained by the decrease of the interaction between monoterpenes  
233 and the pulp resulting of the partial hydrolysis of pectic substances constitutives of the middle  
234 lamella (Ollé *et al* , 1997). One another explanation may be the release of these compounds  
235 from the secretion channels observed by microscopy by Ollé (1997) in mango slices obtained  
236 from mesocarp. The hypothesis given by Schreier and Idstein (1984) which assume that the  
237 maceration of the pulp liberates the oleoresin passages in the mango tissue, is improbable.

238 More supprising is the general decrease of the sesquiterpene concentration occuring  
239 during the enzymatic process. These decreases can result of rearrangment reactions related to the  
240 cyclic structure of these compounds occuring during the process. Endogenous and exogenous  
241 esterases are involved in the lost of fatty acid esters : ethyl laurate, methyl palmitoleate and ethyl  
242 pentadecanoate as previously reported in the case of apple juice (Jakob *et al* , 1973 ; Schreier *et*  
243 *al* , 1978 ; Jennisken *et al* , 1991). However the production of new esters was not detected as a  
244 result of the enzymatic treatment of mango pulp.

245 On the other hand six terpene derivatives not previously reported as free compound have  
246 been identified or tentatively identified (Table 3 ).

247 Terpinen 4-ol and  $\alpha$ -terpineol have been previously reported as aglycon released by acid  
248 (Koulibaly *et al* , 1992) or enzymatic hydrolysis (Sakho *et al* , 1997) of mango glycosidically  
249 bound compounds. 1,8-menthadien-4-ol was tentatively identified in the mango juice obtained  
250 after enzymatic liquefaction ultrafiltration and reversis osmosis (Ollé, 1997). p-menthen-1,5-  
251 dien-8-ol and cis-p-menth-2-en-1,8-diol are identified and tentatively identified for the first time.  
252 it can be assumed that these compounds are present in mango as glycosidically bound form.

### 253 254 **Conclusion**

255 The result reported in present work indicate that stable cloudy preparation are obtained by  
256 enzymatic maceration of mango pulp. This product can be used for the preparation of mango  
257 nectar.

### 258 259 260 261 262 263 **References**

- 264  
265 Askar , A. ; Gierschner , K. H. ; Siliha , H. and El Zoghbi , M. 1990. Polysaccharides and  
266 Cloud Stability of Tropical Nectars. Proceedings XX<sup>th</sup> Symposium of the International  
267 Federation of Fruit juice Producers. p. 207-223 (Ed.) Küdig Druck AG, Zug .  
268 Cantarelli , C. and Razzari , F. 1978. Alternative Fruit Juices Processes. Lebensm. -Wiss. u. -  
269 Technol. 11: 94-102.  
270 Dousse, R. and Lüthi , H.R. 1976. Fondements et Expériences Récentes en Matière  
271 d'Extraction de Jus de Fruits par Diffusion. VIII Congrès International des Jus de  
272 Fruits.p. 53-70. Juris Druck & Verlag Zurich 1977.

- 273 Ishii , S. and Yokotsuka , T. 1975. Purification and Properties of Pectin lyase from *Aspergillus*  
274 *japonicus* . Agric. Biol. Chem. 39: 313-321.
- 275 Jakob , M. Hippler , R. and Lüthi , H. R. 1973. Über den Einfluss Pektolytischer  
276 Enzympräparate auf das Aroma Von Apfelsaft. Lebensmittel-Wiss. u. -Technol. 6: 138-141.
- 277 Jenniskens , L. H. D. ; Voragen , A. G. J. ; Pilnik , W. and Maarten , A. P. 1991. Effects of  
278 Treatment of Apple Pulp with Liquefying Enzymes on the Aroma of Apple Juice.  
279 Lebensmittel-Wiss. u. -Technol. 24: 86-92.
- 280 Koulibaly , A. ; Sakho , M. and Crouzet , J. 1992. Variability of Free and Bound Volatile  
281 Terpenic Compounds in Mango. Lebensmittel-Wiss. u. -Technol. 25: 374-379.
- 282 Ollé , D. ; Baron , A. ; Lozano , Y. F. ; Sznaper , C. Baumes , R. ; Bayonove , C. and  
283 Brillouet , J. M. 1997. Microfiltration and Reverse Osmosis Affect Recovery of Mango  
284 Puree Flavor Compounds. J. Food Sci. in press.
- 285 Ollé , D. Doctoral Thesis. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires  
286 (E.N.S.I.A.) Massy. 1997. Caractérisation des polysaccharides et des Composés  
287 Aromatiques de différents cultivars de Mangue (*Mangifera indica L.* ) . Devenir de ces  
288 Constituants lors de la Préparation de Concentrés Aromatiques Pulpeux.
- 289 Pécout , M. C. ; Crouzet , J. and Aymard C. 1986. Optimisation de la Macération et de la  
290 liquéfaction de la Pulpe de Mangue. Symposium Fédération Internationale des Producteurs  
291 de Jus de Fruits. p. 503-514. Den Haag , Netherlands.
- 292 Pilnik , W. ; Voragen , A. G. J. and de Vos , L. 1975. Enzymatische Verflüssigung von Obst  
293 und Gemüse. Flüss. Obst , 42: 448-451.
- 294 Pilnik , W. and de Vos , L. 1970. Apfelsaft-gewinnung mittels Maische-fermentierung. Flüss.  
295 Obst , 37: 430-432.
- 296 Pilnik , W. 1983. Enzymes in Beverage Industry (Fruit juices, Nectar, Wine, Spirits and Beer).  
297 In Utilisation des Enzymes en Technologie Alimentaire. pp 425-436 (Ed.)P.Dupuy Tec.  
298 &Doc. Lavoisier Paris.
- 299 Rombouts , F. M. and Pilnik , W. 1971. Pektolytische Enzyme in der Fruchtsaftindustrie.  
300 Flüss. Obst , 38: 93-96.

- 302 Sakho , M. ; Chassagne , D. and Crouzet , J. 1997. African mango Glycosidically Bound  
303 Volatile Compounds. J. Agric. Food Chem. 45: 883-888.
- 304 Schreier, P. ; Drawert , F. ; Steiger , G. and Mick , W. 1978. Effect of Enzyme Treatment of  
305 Apple pulp with a commercial Pectinase and Cellulase on the Volatiles of the juice. J. Food  
306 Sci. 43: 1797-1800.
- 307 Schreier, P. and Idstein, H. 1984. Untersuchungen Über die Aromastoffzusammensetzung  
308 enzymatisch verflüssigter Guava (*Psidium guajava* L.) und Mango ( *Mangifera indica* L.,  
309 var. Alphonso ). Fruchtpulpen . Dtsch. Lebensm. Rundsch. 80: 335-340.
- 310 Schreier, P. ; Kittstein-Eberle, R. and Idstein, H. 1985. Untersuchungen zur enzymatischen  
311 Verflüssigung tropischer Fruchtpulpen : Guava (*Psidium guajava* L.), Papaya (*Carica*  
312 *papaya* L. ), Mango (*Mangifera indica* L. var. Alfonso). Flüss. Obst, 7: 365-370.
- 313 Schultz , T. H. ; Flath , R. A. ; Mon , T. R. ; Egglyng , S. B. and Teranishi , R. 1977.  
314 Isolation of Volatile Components from a Model System. J. Agric. Food Chem. 25: 374-  
315 379.
- 316 Sreekantiah, K. R. ; Jaleel, S.A. and Ramachandra Rao, T.N. 1971. Utilization of fungal  
317 Enzymes in the Liquefaction of soft Fruits and Extraction and Clarification of Fruit Juices.  
318 J. Food Sci. Technol. 8 : 201-203.
- 319 Sreenath , H. K. ; Nanjundaswamy , A. M. and Sreekantiah, K. R. 1987. Effect of Various  
320 Cellulases and Pectinases on Viscosity Reduction of Mango Pulp. J. Food Sci. 52: 230 -  
321 231.
- 322 Sreenath , H. K. ; Sudarshana Krishana , K. R. and Santhanam , K. 1995. Enzymatic  
323 Liquefaction of some Varieties of Mango Pulp. Lebensm. -Wiss.u. -Technol. 28: 196 -  
324 200.
- 325 Van Soest , P. J. and Wine , R. H. 1967. Use of Detergent in the Analysis of Fibrous Feed.  
326 IV Determination of Plant Cell wall Constituents. J. AOAC. 50: 50.
- 327 Voragen , A. G. J. and Pilnik , W. 1981. Spezifische Enzymeinwirkung bei der Verflüssigung  
328 von Apfelzellwandpräparaten. Flüss. Obst , 48: 261-264.
- 329  
330

39  
40  
41 **Table 1 : Results of fibers measurement (method of Van Soest, 1967)**  
42  
43

| 44<br>45<br>46<br>47<br>48<br>49<br>50<br>51 | Detergents used        |   |  |
|--|------------------------|---|--|
|  | Treatment              | Acid<br>cellulose<br>(g/100 g fresh pulp) | Neutral<br>cellulose and hemicellulose<br>(g/100 g fresh pulp) |
| 52   | without treatment      | 0.482                                     | 0.755  |
| 53   |                        |   |  |
| 54   | pectolyase             | 0.446                                     | 0.637  |
| 55   | (0.90 U/100 g, 1 hour) |   |  |
| 56   |                        |   |  |
| 57   | Rohament PC            | 0.454                                     | 0.635  |
| 58   | (0.1 g/100 g, 1 hour)  |   |  |
| 59   |                        |   |  |

460  
461  
462  
463  
464

386

387

**Table 2** : Concentration of african mango volatile compounds before and after enzymatic maceration treatment by pectolyase (0.90 U/100g at 50°C during 1hour)

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

| Compounds              | before treatment<br>(mg/kg) | after treatment<br>(mg/kg) |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <u>monoterpenes</u>    |                             |                            |
| $\alpha$ -pinene       | 2.5                         | 9                          |
| $\alpha$ -phellandrene | 0.4                         | 0.9                        |
| car-3-ene              | 99.8                        | 150.8                      |
| limonene               | 2.3                         | 2.5                        |
| $\beta$ -phellandrene  | 0.6                         | 0.4                        |
| $\alpha$ -terpinolene  | 12.3                        | 13.5                       |
| <u>sesquiterpenes</u>  |                             |                            |
| $\delta$ -cubebene     | 0.5                         | 0.4                        |
| $\beta$ -elemene       | 1.4                         | 0.5                        |
| $\alpha$ -gurjunene    | 7.5                         | 6.1                        |
| $\beta$ -caryophyllene | 20.2                        | 14                         |
| aromadendrene          | 1.2                         | 0.8                        |
| $\alpha$ -humulene     | 10.6                        | 6.7                        |

|     |                            |                    |                |
|-----|----------------------------|--------------------|----------------|
| 112 | dehydroaromadendrene       | 0.8                | 0.7            |
| 113 | $\alpha$ -muurolene        | 5.9                | 3.9            |
| 114 | $\delta$ -selinene         | 0.7                | 0.3            |
| 115 | $\gamma$ -cadinene         | 68.5               | 40.6           |
| 116 | unidentified sesquiterpene | 6.6                | 4.7            |
| 117 | unidentified sesquiterpene | 1.4                | 0.9            |
| 118 | 7-epi- $\alpha$ -selinene  | 2.3                | 1.4            |
| 119 |                            |                    |                |
| 120 | <u>esters</u>              |                    |                |
| 121 | ethyl laurate              | 5.4                | 1.5            |
| 122 | methyl palmitate           | trace <sup>a</sup> | - <sup>b</sup> |
| 123 | ethyl-9-palmitate          | trace              | -              |
| 124 | methyl palmitoleate        | 0.8                | 0.5            |
| 125 | ethyl pentadecanoate       | 3.3                | 1.0            |
| 126 |                            |                    |                |
| 127 | <u>miscellaneous</u>       |                    |                |
| 128 | trans-2.6-nonendial        | 3.6                | 9.2            |

---

131 a : trace < 0.1 mg/kg

132 b : not detected

133

134

135

136

137

138

365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385

**Table 3 : Compounds identified after maceration**

| Compounds                 | Identification  |           |                 |
|---------------------------|-----------------|-----------|-----------------|
|                           | RI <sup>a</sup> | reference | MS <sup>b</sup> |
| 1,8-menthadien-4-ol       | 1145            | -         | +               |
| p-menth 1,5-dien-8-ol     | 1158            | 1165      | +               |
| cis-p-menth-2-en-1,8-diol | 1164            | -         | +               |
| terpinen-4-ol             | 1171            | 1180      | +               |
| $\alpha$ -terpineol       | 1188            | 1198      | +               |
| myrtenal                  | 1248            | 1204      | +               |

a linear retention index DB5 MS capillary column

b mass spectra

## Figure Captions

**Figure 1** Effect of pectolyase concentrations (U/100g) on african mango pulp

pectolyase concentrations :

- ◆— 0.30 U/100g
- 0.465 U/100g
- ▲— 0.76 U/100g
- ×— 0.90 U/100g
- \*— 1.32 U/100g
- 1.54 U/100g

**Figure 2** Effect of different enzymes on african mango pulp

different enzymes used :

- Pectolyase 0.90 U /100g
- Rohament PC 15mg/100g
- ▲— Pectinol VR 10.5mg/100g
- ×— Pectinol D5S 9.5mg/100g
- \*— Rohapect TF 9.5mg/100g

**Figure 3** Microscopic pictures of african mango pulp

- a : before enzymatic treatment (x100) = magnifying 100
- b : after pectolyase 0.90 U/100g treatment (x100)
- c : after Rohament PC 0.1g/100g treatment (x100)
- d : presence of fiber after enzymatic treatment (x100)

Coloration : red Congo

**Figure 4** Stability test with different concentrations of pectolyase (U /100g)

different concentrations of pectolyase :

- ◆— 1.54 U/100g
- 1.32 U/100g
- ▲— 0.90 U/100g
- ×— 0.76 U/100g
- \*— 0.465 U/100g
- 0.30 U/100g

Figure 1

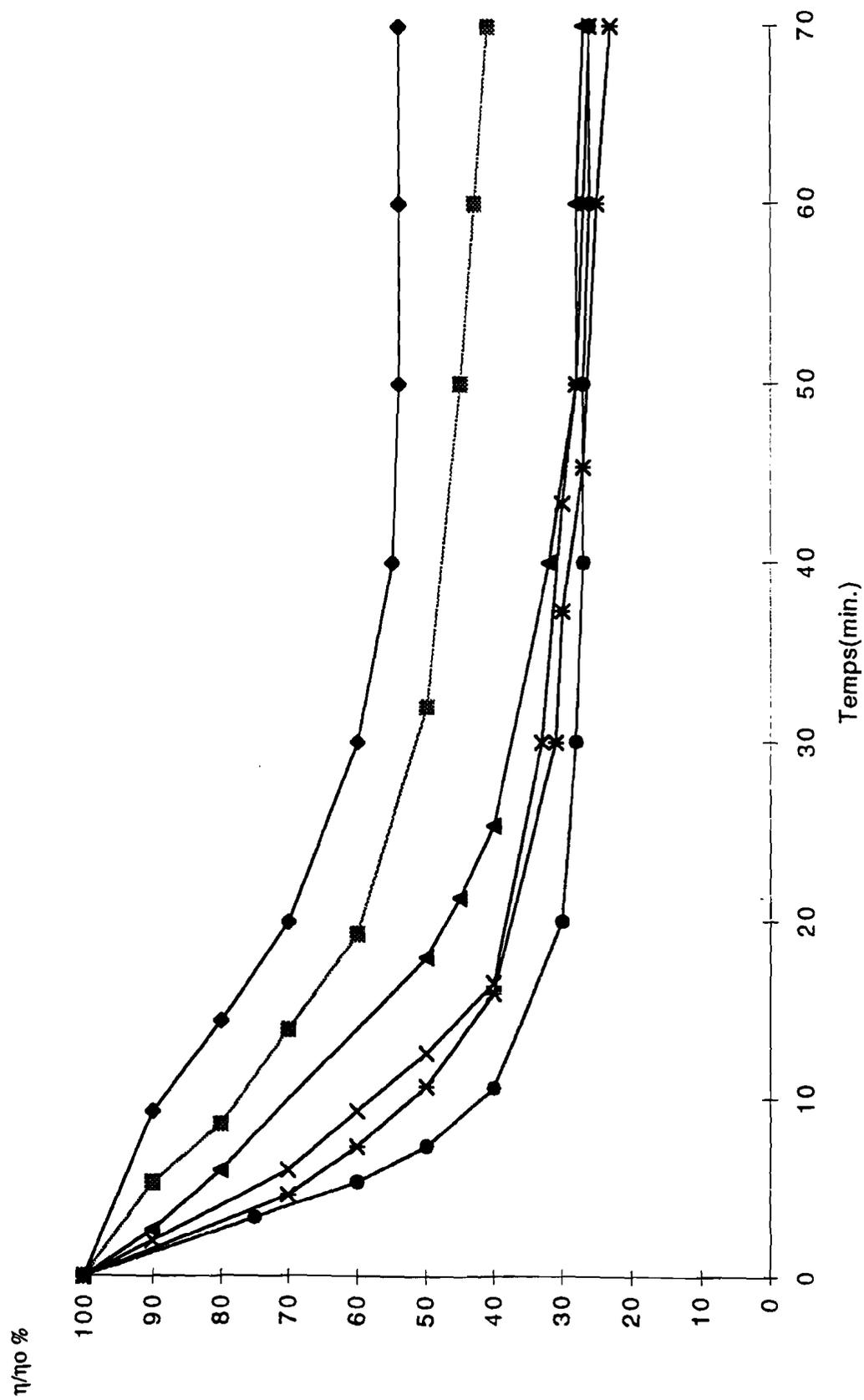
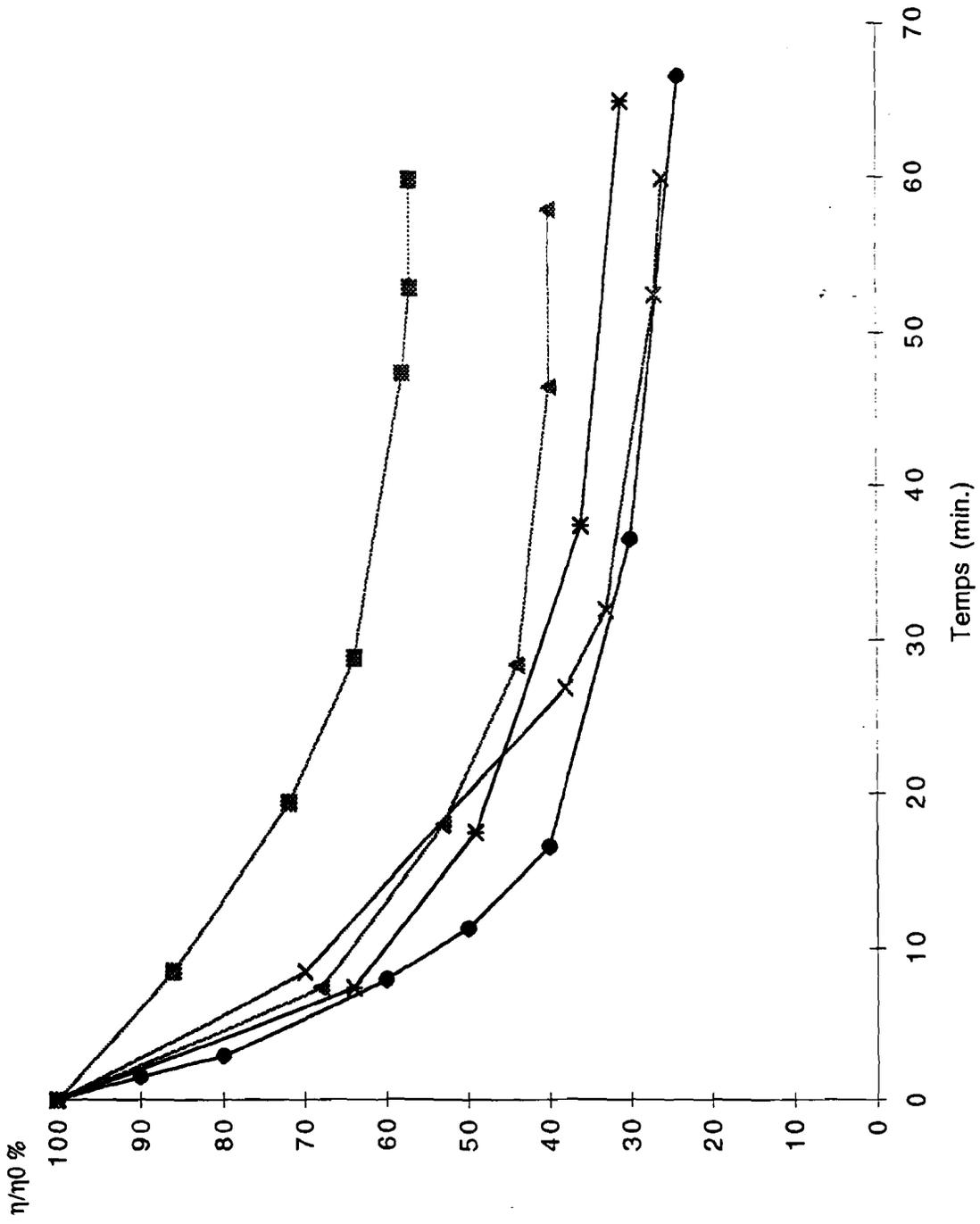
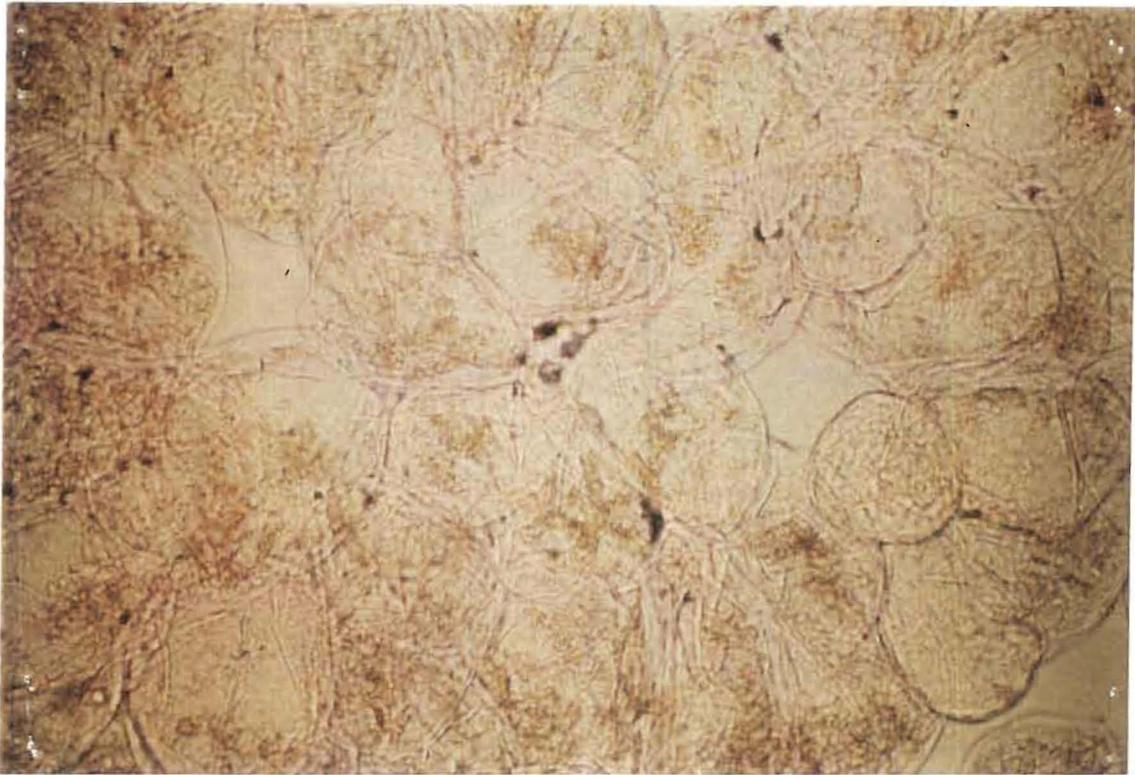
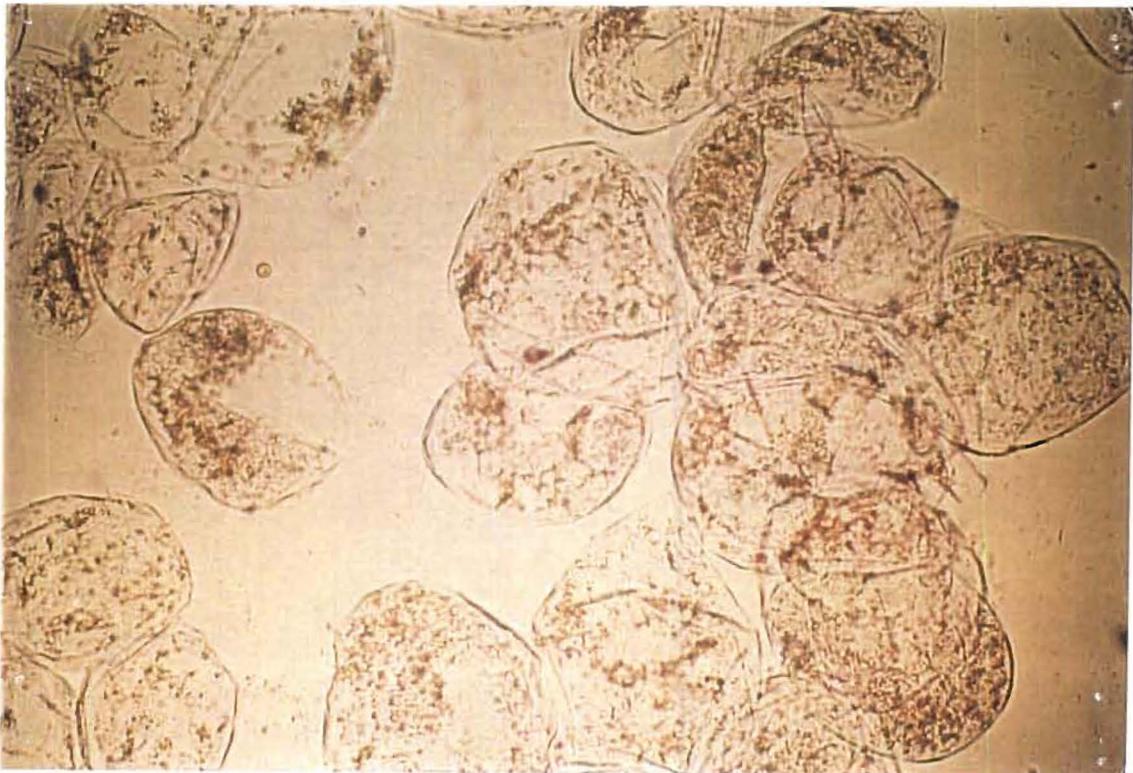


Figure 2





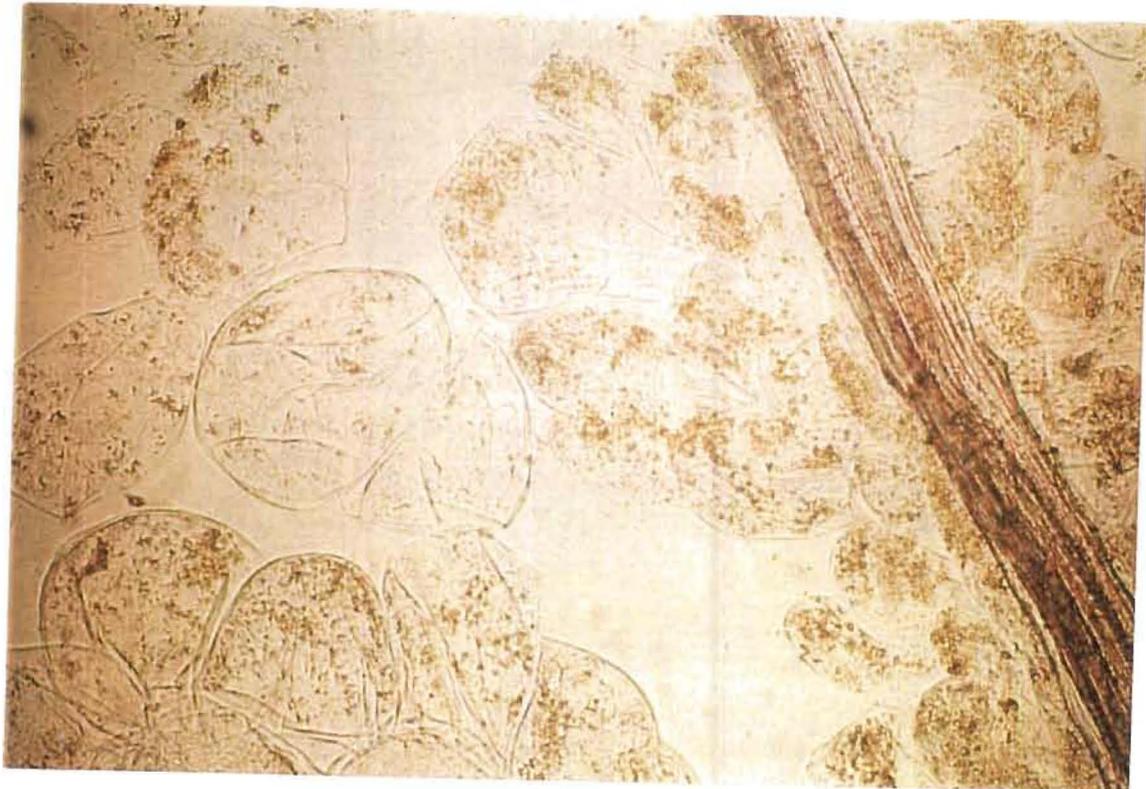
**A** Pulpe de mangue avant traitement enzymatique



**B** Pulpe de mangue après traitement enzymatique par la pectolyase d'*Aspergillus japonicus*

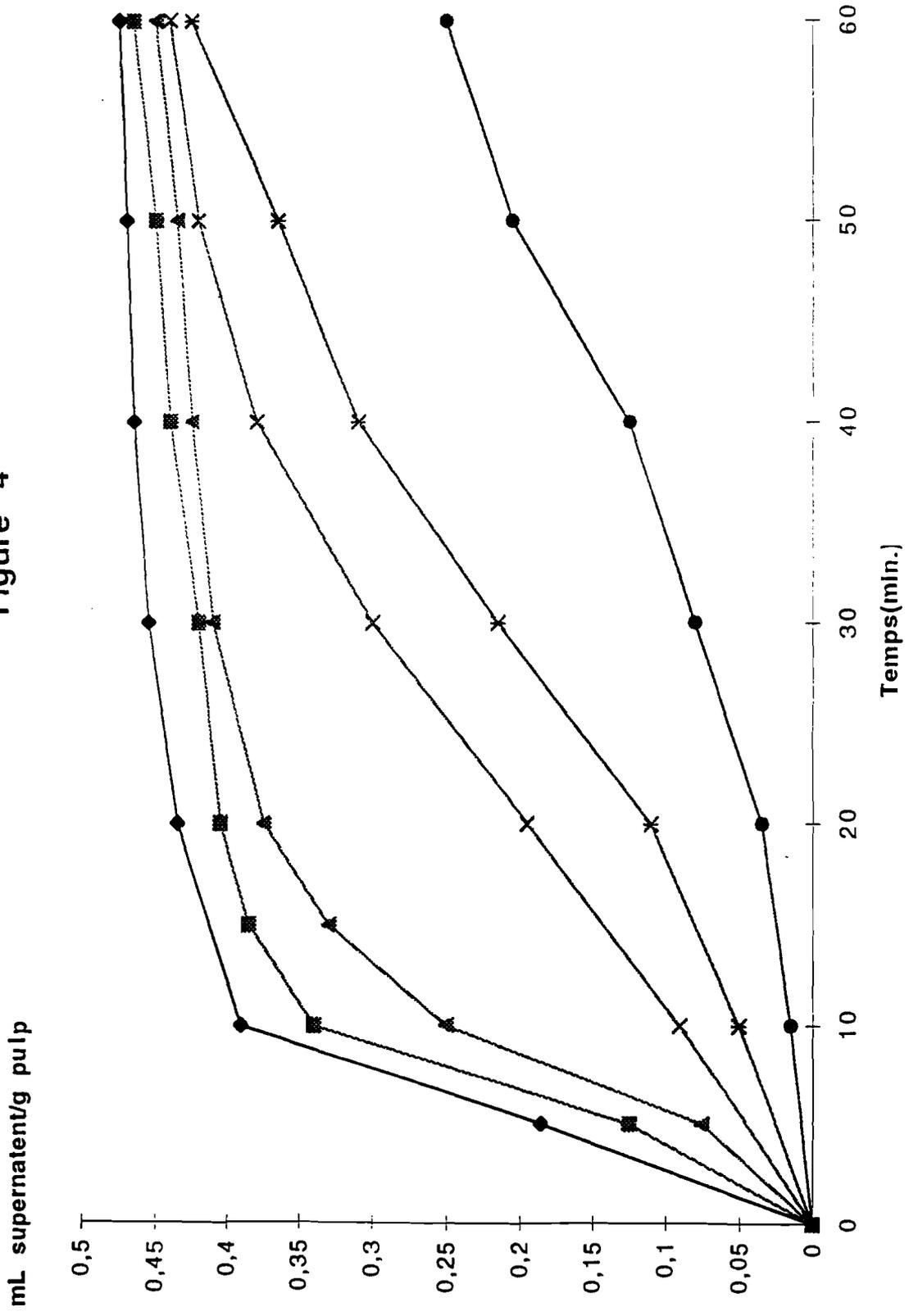


**C** Pulpe de mangue après traitement enzymatique par le Rohament PC



**D** Présence de fibres après traitement enzymatique

Figure 4



L'analyse chromatographique et spectrale de l'extrait volatil de la pulpe de mangue avant et après traitement enzymatique a permis de comparer les deux profils aromatiques (Fig 19).

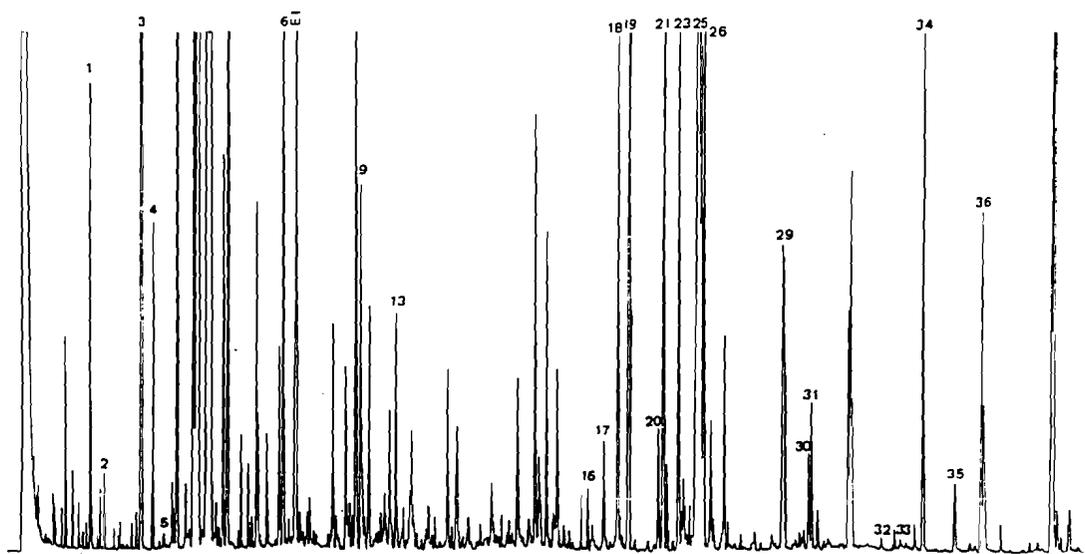
Après identification des composés par comparaison des indices de rétention et spectres de masse avec ceux d'échantillons de référence, nous avons pu constater les différences données dans le tableau 16. Une augmentation de concentrations de certains composés terpéniques, précisément les monoterpènes, a été observée après traitement enzymatique à l'exception du  $\beta$ -phellandrène.

Une augmentation qui pourrait résulter de la libération de ces composés piégés auparavant entre les macromolécules de substances pectiques de la lamelle moyenne, qui sont partiellement hydrolysées après traitement enzymatique (Ollé et *al.*, 1997), ou bien ils pourraient provenir de canaux de sécrétion observés en microscope (Ollé, 1997) sur les tranches de mésocarpe de mangue. Selon Schreier et Idstein (1984) cette augmentation serait due au passage de l'oléorésine dans le tissu de la mangue.

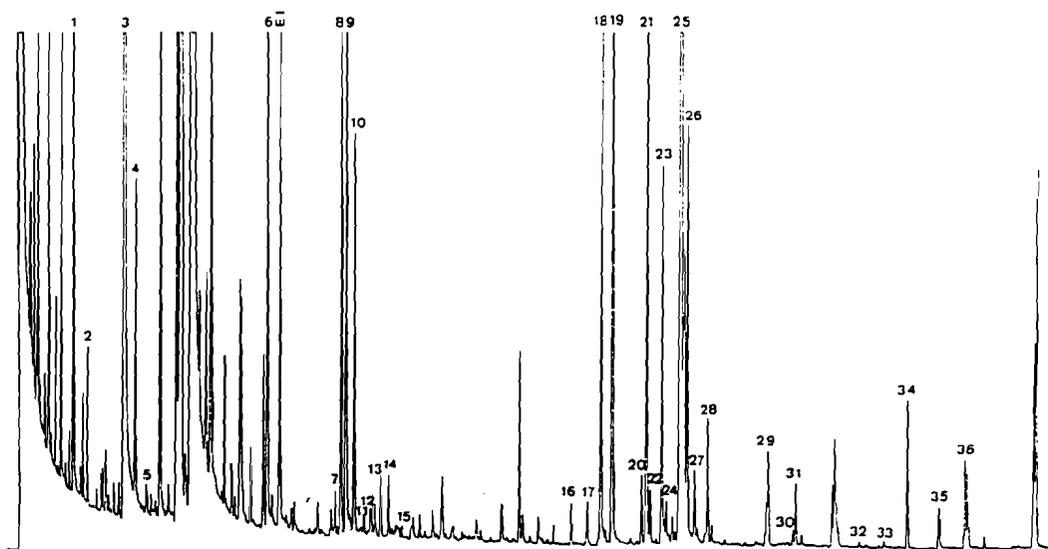
Par ailleurs, nous constatons une baisse de concentrations des sesquiterpènes qui pourrait résulter de réactions de réarrangement de ces structures cycliques. Tandis que Schreier et Idstein (1984) avaient observé une croissance de la teneur en  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -humulène lors de la liquéfaction enzymatique de la pulpe de mangue variété « Alphonso ».

D'autre part, nous avons remarqué une diminution de la concentration des esters d'acide gras : laurate d'éthyle, palmitate de méthyle, palmitoléate de méthyle, palmitate d'éthyle et pentadécanoate d'éthyle. Diminution qui laisse supposer l'action des estérases endogènes et exogènes comme l'avaient indiqué certains auteurs dans le jus de pomme (Jakob et *al.*, 1973 ; Schreier et *al.*, 1978 ; Jennissen et *al.*, 1991), cependant la formation de nouveaux esters n'a pas été détectée après traitement enzymatique de la pulpe de mangue.

Parallèlement, nous avons tenté d'identifier par comparaison des indices de rétentions et des spectres de masse de référence, certains composés nouveaux par rapport à l'échantillon non traité (tableau 17).



Chromatogramme des composés volatils avant traitement



Chromatogramme des composés volatils après traitement

Figure 19 : Chromatogrammes des composés volatils de la mangue avant et après traitement enzymatique (macération) par la pectolyase d'*Aspergillus japonicus*.

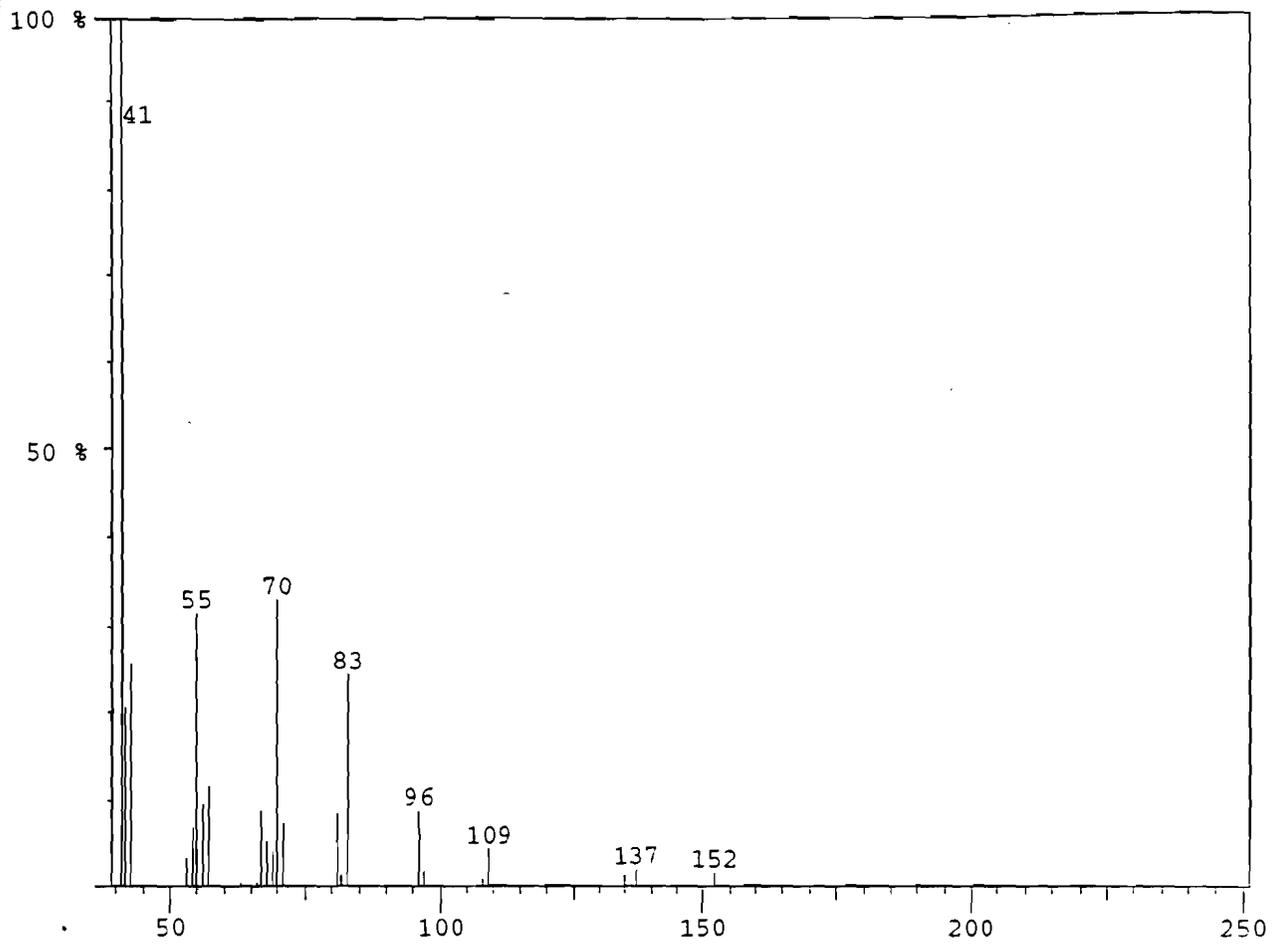
Tableau 16 : Concentration de composés aromatiques avant et après traitement enzymatique (macération) par la pectolyase d' *Aspergillus japonicus*

| n° pic                | Composés                    | Avant traitement   | Après traitement | Indice de référence |                   |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|
|                       |                             | mg/kg              | mg/kg            | IR                  | Ir <sub>réf</sub> |
| <u>Monoterpènes</u>   |                             |                    |                  |                     |                   |
| 1                     | $\alpha$ -pinène            | 2,5                | 9                | 930                 | 932               |
| 2                     | $\alpha$ -phellandrene      | 0,4                | 0,9              | 1001                | 1005              |
| 3                     | car-3-ène                   | 99,8               | 150,8            | 1012                | 1009              |
| 4                     | Limonène                    | 2,3                | 2,5              | 1025                | 1031              |
| 5                     | $\beta$ -phellandrène       | 0,6                | 0,4              | 1030                | 1034              |
| 6                     | $\alpha$ -terpinolène       | 12,3               | 13,5             | 1077                | 1088              |
| <u>Sesquiterpènes</u> |                             |                    |                  |                     |                   |
| 16                    | $\delta$ -cubebène          | 0,5                | 0,4              | 1361                | 1350              |
| 17                    | $\beta$ -élèmene            | 1,4                | 0,5              | 1376                | 1391              |
| 18                    | $\alpha$ -gurjunène         | 7,5                | 6,1              | 1389                | 1409              |
| 19                    | $\beta$ -curyophyllène      | 20,2               | 14               | 1408                | 1417              |
| 20                    | Aromadendrène               | 1,2                | 0,8              | 1431                | 1439              |
| 21                    | $\alpha$ -humulène          | 10,6               | 6,7              | 1437                | 1454              |
| 22                    | Dehydroaromadendrène        | 0,8                | 0,7              | 1442                | 1459              |
| 23                    | $\alpha$ -muurolène         | 5,9                | 3,9              | 1453                | 1498              |
| 24                    | $\delta$ -selinène          | 0,7                | 0,3              | 1458                | -                 |
| 25                    | $\gamma$ -cadinène          | 68,5               | 40,6             | 1475                | 1513              |
| 26                    | Sesquiterpène non identifié | 6,6                | 4,7              | 1482                | -                 |
| 27                    | Sesquiterpène non identifié | 1,4                | 0,9              | 1488                | -                 |
| 28                    | 7-épi- $\alpha$ -sélénene   | 2,3                | 1,4              | 1500                | 1517              |
| <u>Esters</u>         |                             |                    |                  |                     |                   |
| 29                    | Laurate d'éthyle            | 5,4                | 1,5              | 1564                | 1595              |
| 32                    | Palmitate de méthyle        | trace <sup>a</sup> | - <sup>b</sup>   | 1900                | 1916              |
| 33                    | 9-palmitate d'éthyle        | trace              | -                | 1935                | 1955              |
| 35                    | Palmitoléate de méthyle     | 0,8                | 0,5              | 1953                | -                 |
| 36                    | Pentadécanoate d'éthyle     | 3,3                | 1,0              | 1980                | 1991              |
| <u>Divers</u>         |                             |                    |                  |                     |                   |
| 9                     | Trans-2,6-noendial          | 3,6                | 9,2              | 1150                | 1145              |

a : trace < 0,1 mg/kg

b : non détecté

c : indice de rétention sur colonne DB5



**Figure 20 : Spectre de masse d'un composé non identifié.**

Tableau 17 : Composés identifiés après traitement enzymatique de la pulpe de mangue par la pectolyase

| n° pic | Composés                   | Indice de rétention <sup>a</sup> |                   | Concentrations<br>mg/kg |
|--------|----------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------|
|        |                            | IR                               | Ir <sub>réf</sub> |                         |
| 8      | 1,8 -mentadien-4-ol        | 1145                             | -                 | 5,9                     |
| 10     | p-menth-1,5-dien-8-ol      | 1158                             | 1165              | 4,1                     |
| 11     | cis-p-menth-2-en -1,8-diol | 1164                             | -                 | 0,3                     |
| 12     | terpinen-4-ol              | 1171                             | 1180              | 0,3                     |
| 14     | $\alpha$ -terpinéol        | 1188                             | 1198              | 0,7                     |
| 15     | myrtenal                   | 1248                             | 1204              | trace <sup>b</sup>      |

a : indice de rétention sur colonne DB5

b : trace < 0,1 mg/kg

Le tableau 17 présente des alcools et un aldéhyde à l'état de trace. Le 1,8-mentadien-4-ol que nous avons tenté d'identifier sur la base de spectres de masse a été détecté après liquéfaction enzymatique, ultrafiltration et osmose inverse de pulpe de mangue par Ollé (1997).

Le p-menth-1,5-dien-8-ol ( $\alpha$ -phellandren-8-ol) et le cis-p-menth-2-en-1,8-diol révélés pour la première fois, ont été identifiés, pour le premier par comparaison avec des indices de rétention et de spectres de masse de référence, et pour le deuxième sur la base de spectres de masse de référence.

Un composé non identifié, d'indice de rétention 1139 dont le spectre de masse (Fig. 20), pourrait correspondre à un composé monoterpénique de formule  $C_{10}H_{16}O$ . En effet, son spectre de masse présente un fragment à  $m/z = 152$  caractéristique du pic moléculaire de ces composés.

Des ions fragment à  $m/z = 137$  et 109 résultant, respectivement de la perte d'un groupe méthyl  $CH_3$  ( $m = 15$ ) et d'un groupe isopropyl ou méthyl cétone ( $m = 43$ ), ne permettent pas de trancher entre un alcool ou une cétone. En effet, le pinocarvéol possède des fragments à  $m/z = 41, 55, 70$  et 109, la tagetone des fragments à  $m/z = 109, 137, 152$  et la pinocamphone des fragments à  $m/z = 41, 55, 83, 109$  et 152, tous comparables avec les fragments du composé.

Parmi ces alcools, le terpinen-4-ol et l' $\alpha$ -terpinéol ont été détectés par Hunter et *al.* (1974) comme substances volatiles libres de la mangue variété Alphonso en conserve. Cependant, nous ne les avons pas identifiés dans la fraction volatile de la variété mango, mais uniquement dans la fraction liée comme aglycone des précurseurs d'arôme. Ils ont été obtenus

après hydrolyse acide des hétérosides par Koulibaly (1989) et l' $\alpha$ -terpinéol après hydrolyse enzymatique par Sakho et *al.* (1997).

Toutefois, il convient de rappeler que l' $\alpha$ -terpinéol a été observé lors du traitement thermique du jus d'abricot (Crouzet et *al.*, 1983), de la pulpe de mangue (Sakho et *al.*, 1985b), au pH naturel du jus qui est légèrement acide dans le cas de la mangue (4 à 4,8). Schreier et *al.* (1977b) signalent que le chauffage du jus d'orange en cours de « flash pasteurisation » ou de pasteurisation entraîne une augmentation du terpinen-4 ol et de l' $\alpha$ -terpinéol ainsi que d'autres composés par rapport au jus non traité.

Ainsi, on peut penser que ces composés trouvés dans la fraction volatile libre de la mangue variété Alphonso en conserve sont probablement dus à l'effet du traitement thermique en milieu acide de la pulpe. Comme c'était le cas du jus d'abricot, pulpe de mangue et jus d'orange après chauffage, où la présence de ces constituants ne semble plus se justifier uniquement par un réarrangement de composés, mais par la libération probable d'aglycone à la suite d'hydrolyse, dans un milieu acide, de précurseurs d'arôme.

Par conséquent, la formation de l' $\alpha$ -terpinéol aussi bien des autres alcools terpéniques dans l'échantillon traité est due certainement à l'effet de la macération donc à l'action des enzymes par hydrolyse des hétérosides de la pulpe de mangue. Surtout que les préparations enzymatiques pectolytiques et cellulolytiques du commerce ont la particularité de renfermer des activités secondaires correspondant à des glycosidases. Cordonnier et *al.* (1989) ont montré que ces préparations présentent toutes des activités :  $\beta$ -D-glucopyranosidase,  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase et  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

Les résultats obtenus permettent de constater une certaine influence du traitement enzymatique (macération) par la pectolyase sur les composés d'arôme de la mangue. Une modification qui s'est manifestée par l'augmentation et la baisse de concentrations de certains constituants et par l'apparition de nouvelles substances en majorité des alcools terpéniques.

Contrairement à Schreier et Idstein (1984) nous n'avons pas identifié un certain nombre d'aldéhydes, ni mis en évidence la formation de nouveaux esters qui pourraient détériorer l'arôme de mangue.

# CONCLUSION

L'arôme, un facteur d'appréciation des produits alimentaires, notamment des fruits et de leurs dérivés, a fait l'objet de nombreuses études.

Les composés responsables de l'arôme peuvent exister sous forme libre ou sous forme d'hétérosides ou précurseurs d'arôme. A partir de ces derniers, les composés d'arôme peuvent être libérés.

Ainsi, nous nous sommes proposés d'étudier les constituants d'arôme présents dans la mangue et les modifications qu'ils subissent au cours de traitements technologiques, plus particulièrement traitement thermique et enzymatique.

Nous avons d'abord analysé dans une première partie, les constituants volatils de la mangue, variété "mango" et de cinq autres variétés : "Amélie", "Muscat", "Papaye", "Gouverneur" et "Pêche".

L'extraction des composés volatils a été effectuée par différentes techniques : évaporation sous vide à une température de l'ordre de 50°C, par distillation extraction simultanées (SDE) et par adsorption sur polymère poreux pour les constituants les plus volatils.

La chromatographie en phase gazeuse et le couplage CPG-SM nous a permis d'identifier de nombreux composés déjà signalés dans la littérature comme appartenant à l'arôme de mangue, mais aussi, nous avons mis en évidence la présence de nouveaux composés détectés pour la première fois, tels que composés terpéniques : éremophilène, isolongifolène ; composés liés au métabolisme des acides gras : lactones, esters éthyliques.

Par ailleurs, l'étude des substances non volatiles, précurseurs d'arôme, isolées par chromatographie sur phase inverse (type  $C_{18}$ ) a permis de déterminer leur teneur et de la comparer à celle des constituants volatils libres. Nous avons constaté que la concentration en précurseurs, composés liés, était supérieure à celle des composés volatils libres pour toutes les variétés étudiées et que le rapport de la teneur de liés sur libres était plus élevé pour la variété "mango" (3,8) et pour la variété "Gouverneur" (2,5), que pour les autres variétés. Nous avons également précisé la nature de certains aglycones libérés (des alcools monoterpéniques), après hydrolyse acide.

Dans un deuxième chapitre, nous avons entrepris l'analyse des précurseurs d'arôme qui constituent une cause importante de modification d'arôme de jus de fruits au cours de traitements technologiques, mais également un potentiel aromatique qui peut être exploité de manière contrôlée.

Les précurseurs sous forme glycosidique de la pulpe de mangue ont été extraits cette fois sur résine Amberlite XAD-2, et ont été soumis à l'analyse, afin d'établir leur structure.

Une première détermination indirecte après hydrolyse acide et enzymatique a été effectuée sur la copule osidique et également sur la partie aglycone.

L'analyse des oses après transformation en acétate d'alditol, dérivation par TMS après hydrolyse et perméthylation, a permis de noter l'importance du glucose (80 %) suivi de

l'arabinose (environ 10 %), le xylose, l'apiose, le rhamnose et le galactose étant présents en faible pourcentage. Ainsi sur la base des structures des glycosides déjà connues dans d'autres fruits et des résultats obtenus après perméthylation, nous avons établi les structures possibles des hétérosides de la pulpe de mangue étudiée, variété « mango ». L'extrait glycosidique serait constitué de 70 % de monoglucosides et de 30 % de diglycosides répartis en gentiobiosides, arabinosides, apiosides et rutinoides.

Les hypothèses concernant la nature de la copule glucidique ont été confirmées en partie par l'analyse directe de l'extrait hétérosidique après dérivation et analyse en chromatographie en phase gazeuse et couplage CPG-SM. L'identification par comparaison des données chromatographiques et spectrales avec celles des composés de référence disponibles ou synthétisés, a permis de préciser la présence de glucoside de furanéol, de vomifoliol, d'eugénol, de vanilline, d'alcool benzylique, de 2-phenyléthanol, d' $\alpha$ -terpinéol parmi les monoglucosides ; et parmi les diglycosides : le rutinoides de 2-phenyléthanol, d' $\alpha$ -terpinéol, d'alcool benzylique, l'arabinoside d' $\alpha$ -terpinéol. Les gentiobiosides et les apiosides ont été détectés sur la base de leur spectre de masse.

Par ailleurs, des composés de référence ont permis d'identifier les aglycones libérés après hydrolyse enzymatique. Nous avons pu noter la libération d'alcools aliphatiques, d'alcools monoterpéniques, d'alcools aromatiques, d'acides gras et de composés C<sub>13</sub> norisoprénoïdes.

L'influence de traitements thermiques et enzymatiques a été abordée dans le dernier chapitre.

Des modifications ont été observées après chauffage de la pulpe de mangue à 95°C pendant 10 minutes. Une augmentation relative de la concentration en  $\alpha$ -terpinéol, une baisse au niveau de certains composés terpéniques (érémophilène) ont été constatées de même que la formation de composés furaniques (furfural, acétyl furane, alcool furfurylique) et des composés résultant de la dégradation du  $\beta$ -carotène (perte de 37 %) et de l'acide ascorbique (50 %).

La formation d'  $\alpha$ -terpinéol et de composés furaniques en quantité importante est préjudiciable aux caractéristiques organoleptiques.

Dans le but de préparer des jus de mangue moins visqueux mais pulpeux avec un trouble stable, nous avons envisagé le traitement enzymatique de la pulpe de mangue par macération.

Le traitement par la pectolyase et quatre autres préparations enzymatiques industrielles : Rohament PC, Rohapect TF, Pectinol D5S et VR, a permis d'obtenir une suspension cellulaire sans destruction de la paroi, engendrant ainsi une baisse de viscosité de 50 % à des temps différents selon les enzymes.

L'observation des cellules de la pulpe de mangue au microscope montre une différence entre la pulpe avant et après traitement enzymatique par la pectolyase et le Rohament PC, permettant de déduire que ces enzymes conviennent pour la macération.

Le test de stabilité effectué en présence de pectolyase, à différentes concentrations d'enzymes, par mesure du volume du surnageant après centrifugation, laisse supposer que la stabilité du trouble dépend de la quantité d'enzyme mise en jeu.

Finalement l'analyse des constituants volatils avant et après traitement enzymatique par la pectolyase de la pulpe de mangue, a permis de constater une augmentation relative de la concentration en composés monoterpéniques d'une part, et d'autre part, la diminution de la concentration relative en sesquiterpènes et en esters d'acide gras.

Par ailleurs, nous avons noté de nouveaux composés présents après traitement enzymatique, en majorité identifiés comme des alcools terpéniques. Ces substances pourraient résulter de l'hydrolyse de glycosides précurseurs d'arômes.

L'ensemble du travail nous a permis d'améliorer nos connaissances sur les composés aromatiques de la pulpe de mangue, notamment sur la nature des substances volatiles libres et celle des substances non volatiles liées ou précurseurs d'arôme. La question de savoir si les nouveaux composés apparus après traitement, particulièrement enzymatique, ainsi que les concentrations affectées, ne risquent pas de perturber de façon défavorable l'équilibre entre les différentes substances volatiles responsables de l'arôme de mangue, même si en général les alcools monoterpéniques sont responsables d'une agréable note fruitée ou florale, reste posée.

D'autre part, des études doivent être menées afin d'approfondir les connaissances sur la structure des extraits glycosidiques de mangue, susceptibles d'être hydrolysés durant les traitements technologiques ou d'être exploités en tant que potentiel d'arôme.

En particulier, il conviendrait de confirmer les résultats que nous avons obtenus concernant les gentiobiosides et les apioglucosides. On peut envisager l'isolement de fractions riches en ces composés en utilisant différentes techniques chromatographiques, notamment la chromatographie à contre-courant. Par ailleurs, les progrès réalisés en matière de couplage HPLC-Spectromètre de Masse laissent penser que l'application de cette technique nous permettra de progresser dans la voie de l'identification de ces composés.

# ANNEXES

- Annexe 1      Matériels et méthodes**
- Annexe 2      Monoterpènes identifiés dans la pulpe de mangue**
- Annexe 3      Sesquiterpènes identifiés dans la pulpe de mangue**
- Annexe 4      Alcools identifiés comme aglycones dans la pulpe de mangue**
- Annexe 5      Composés norisoprénoïdes en C<sub>13</sub> identifiés comme aglycones dans la pulpe de mangue**
- Annexe 6      Dégradation de l'acide ascorbique**
- Annexe 7      Réaction de Maillard**
- Annexe 8      Dégradation de Strecker**

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I MATÉRIELS</b>   | <b>40</b> |
| <b>I-1 Matériel végétal</b>  | <b>40</b> |
| <b>I-2 Matériel chromatographique et spectrométrique</b>           | <b>40</b> |
| <b>I-3 Produits biologiques et chimiques</b>                       | <b>41</b> |
| <b>I-3-1 Biologiques</b>   | <b>41</b> |
| <b>I-3-2 Chimiques</b>   | <b>41</b> |
| <br>   |           |
| <b>II MÉTHODES</b>   | <b>41</b> |
| <b>II-1 Isolement des hétérosides</b>                              | <b>41</b> |
| <b>II-1-1 Préparation du jus</b>                                   | <b>42</b> |
| <b>II-1-1-1 Préparation du sérum et du culot</b>                   | <b>42</b> |
| <b>II-1-1-2 Préparation du jus clair</b>                           | <b>42</b> |
| <b>II-1-2 Séparation des hétérosides</b>                           | <b>42</b> |
| <b>II-1-2-1 Extraction sur colonne de résine Amberlite</b>         | <b>43</b> |
| <b>XAD-2</b>   |           |
| <b>II-1-2-2 Fractionnement des hétérosides par chromatographie</b> |           |
| <b>sur colonne de silice</b>                                       | <b>43</b> |
| <b>II-2 Hydrolyse des hétérosides</b>                              | <b>44</b> |
| <b>II-2-1 Hydrolyse enzymatique</b>                                | <b>44</b> |
| <b>II-2-2 Hydrolyse acide</b>                                      | <b>44</b> |
| <b>II-3 Analyse des glycosides</b>                                 | <b>45</b> |
| <b>II-3-1 Composition en oses des glycosides</b>                   | <b>45</b> |
| <b>II-3-1-1 Analyse en chromatographie sur couche</b>              |           |
| <b>mince (CCM)</b>   | <b>45</b> |
| <b>II-3-1-2 Dosage des oses neutres</b>                            | <b>45</b> |
| <b>II-3-1-3 Analyse de structure des glycosides par</b>            |           |
| <b>perméthylation</b>  | <b>46</b> |
| <b>II-3-2 Les aglycones</b>  | <b>48</b> |
| <b>II-3-3 Analyse des glycosides après dérivation</b>              | <b>49</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>II-4 Méthode d'identification des constituants avec le couplage CPG-SM</b>        | <b>50</b> |
| <b>II-4-1 Principe du couplage CPG-SM</b>  | <b>50</b> |
| <b>II-4-2 Conditions d'analyse avec un mode d'ionisation par impact électronique</b> | <b>51</b> |
| <b>II-4-3 Conditions d'analyse avec un mode d'ionisation chimique</b>                | <b>52</b> |
| <b>II-5 Synthèse du <math>\beta</math>-D-glucopyranoside de furanéol</b>             | <b>52</b> |

# MATERIEL ET METHODES

## I Matériel

### I-1 Matériel végétal

Les mangos, variété sauvage (non greffée) utilisée pour nos travaux, de couleur jaune orange à maturité et fibreuse, ont une forme ovoïde. Compte tenu de leur vitesse de périssabilité quand elles sont mûres, la pulpe a été extraite dès l'achat et conditionnée dans des sachets de 1 kg, puis congelée à -18°C à l'atelier pilote de l'Institut de Technologie Alimentaire de DAKAR (ITA). Elle a été transportée sous forme congelée dans des cartons isolants.

L'opération s'est déroulée aux mois de mai-juin, période de maturité de cette variété. Les mangues ont été achetées dans la région de DAKAR.

### I-2 Matériel chromatographique et spectrométrique

- **Chromatographie sur Couche Mince (CCM)**
  - Feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 : 0,2 mm d'épaisseur (Merck)
- **Chromatographie sur colonne**
  - Chromatographie sur résine Amberlite XAD-2 (Röhm and Haas France)
  - Chromatographie sur gel de silice : chromagel 60 A granulométrie 40-60 microns (SDS)
- **Chromatographie en phase gazeuse**
  - Chromatographe Varian 3300 équipé d'une colonne capillaire en silice fondue à phase stationnaire greffée DB5 (J & W Scientific). Une colonne DB-225 a également été utilisée. Les débits d'hydrogène, d'azote et d'air de la flamme au détecteur sont respectivement 30, 30 et 300 ml/min. La température du détecteur à ionisation de flamme est à 300°C et celle de l'injecteur à 250°C.
- **Couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CPG-SM)**
  - Chromatographe Varian 3400, mêmes conditions que ci-dessus, couplé à un spectromètre à filtre de masse quadripolaire Automass 020 (Unicam), température source : 150°C avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

## **I-3 Produits biologiques et chimiques**

### **I-3-1 Biologiques**

- Pectinase d'*Aspergillus niger* (Sigma),
- Cellulase d'*Aspergillus niger* (Sigma),
- Pectinol D5S, Rohapect D5L (Röhm).

### **I-3-2 Chimiques**

#### **Solvants**

- Les solvants de qualité supérieure pour analyse (Merck, RS et RPE, Carlo Erba, Fluka),
- Pyridine anhydre (Prolabo) distillée sur potasse.

#### **Composés d'arôme**

- Pureté 95 % à 99 % (Fluka, Aldrich).

#### **Hétérosides**

- $\beta$ -D-glucopyranosides de phényl (Sigma),  $\alpha$ -bromo-glucose tétraacétylé (Fluka),
- Les hétérosides de terpénols et d'alcools aromatiques témoins ont été synthétisés par Salles (1989) au laboratoire du Professeur Crouzet de l'Université Montpellier II,
- Glucoside de vomifoliol gracieusement offert par Mme Baltenweck-Guyot et M. Albrecht - Laboratoire de Chimie Organique et Substances Naturelles, Institut de Chimie - Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Glucoside de furanéol synthétisé au Laboratoire du Professeur Crouzet de l'Université Montpellier II.

#### **Réactifs divers**

- N-(naphtyl-1)-éthylènediamine dihydrochlorure (NEDIAC) (Merck),
- N-méthyl-bis-trifluoroacétamide (MBTFA) (Pierce),
- N-O-bis triméthylsilyl-trifluoroacétamide + 1 % triméthylchlorosilane (BSTFA + 1 % TMCS) (Pierce),
- Iodure de méthyle (Fluka),
- Hydrure de sodium - conservé sous vide sur anhydride phosphorique (Fluka).

## **II Méthodes**

### **II-1 Isolement des hétérosides**

## **II-1-1 Préparation du jus**

### **II-1-1-1 Préparation du sérum et du culot**

La pulpe de mangue décongelée et homogénéisée, puis diluée au demi compte tenu de sa viscosité, est centrifugée à 3000 tours/min pendant 15 minutes à 10°C.

Le surnageant ou sérum est récupéré de même que le culot pour une extraction ultérieure des hétérosides.

### **II-1-1-2 Préparation du jus clair**

La pulpe, très visqueuse, homogénéisée, va subir un traitement enzymatique pour sa liquéfaction, en présence simultanée de cellulase à 50 g/l, de pectinol D5S (Rohapect D5L) à 3 g/l et de polyvinylpyrrolidone (PVP) à 0,2 g/l. Ce traitement, 90 minutes à 25°C va permettre après deux centrifugations successives à 5000 tours/min pendant 15 minutes et 8000 tours/min pour le même temps, l'obtention d'un jus clair, très limpide, de couleur jaune clair qui sera déposé sur une colonne de résine d'Amberlite XAD-2.

Le culot récupéré en (1) va subir le même traitement enzymatique pour sa liquéfaction.

Cette méthode de liquéfaction a été mise au point par SALLES (1989), après une étude sur un mélange modèle de divers hétérosides de synthèse. Il avait montré que dans les conditions de liquéfaction (pH du fruit, température de 25°C et durée traitement de 90 minutes), les  $\beta$ -D glucosides, et les  $\beta$ -D rutinosides des terpénols étaient peu ou pas hydrolysés. Seuls 10 % des  $\beta$ -D rutinosides sont transformés en  $\beta$ -D glucosides.

## **II-1-2 Séparation des hétérosides**

Les hétérosides précurseurs d'arôme, ou fraction liée, sont présents en très faibles quantités, de l'ordre de quelques dixièmes à quelques mg par kg de pulpe (ppm), dans les jus de fruits. Leur extraction et leur isolement nécessitent des processus bien adaptés afin d'obtenir des extraits exempts d'impuretés.

Des travaux ont été réalisés sur le mode d'extraction des hétérosides : extraction à froid sur des feuilles ou fleurs broyées au solvant polaire (Francis et Allcock, 1969 ; Sakata et Mitsui,

1975 ; Fabre et Ambid, 1988) ; extraction en continu de feuilles de menthe à l'éther éthylique à chaud (Croteau et Martinkus, 1979).

Dans le cas des fruits ou jus de fruit l'extraction est plus délicate, compte tenu de la présence de différents composés : eau, sucres, pigments acides organiques, substances pectiques, etc... qui doivent être au préalable éliminés.

#### **II-1-2-1 Extraction sur colonne de résine Amberlite XAD-2**

Nous avons utilisé la méthode de Günata et *al.* (1985) qui consiste à percoler le jus sur un adsorbant solide : résine Amberlite XAD-2 contenu dans une colonne (Fig 21). C'est une chromatographie d'adsorption qui permet l'isolement et la séparation des hétérosides par rétention sélective.

La résine est au préalable purifiée par trois extractions successives au Soxhlet et par du méthanol, de l'acétonitrile et de l'éther diéthylique pendant 8 heures pour chaque solvant.

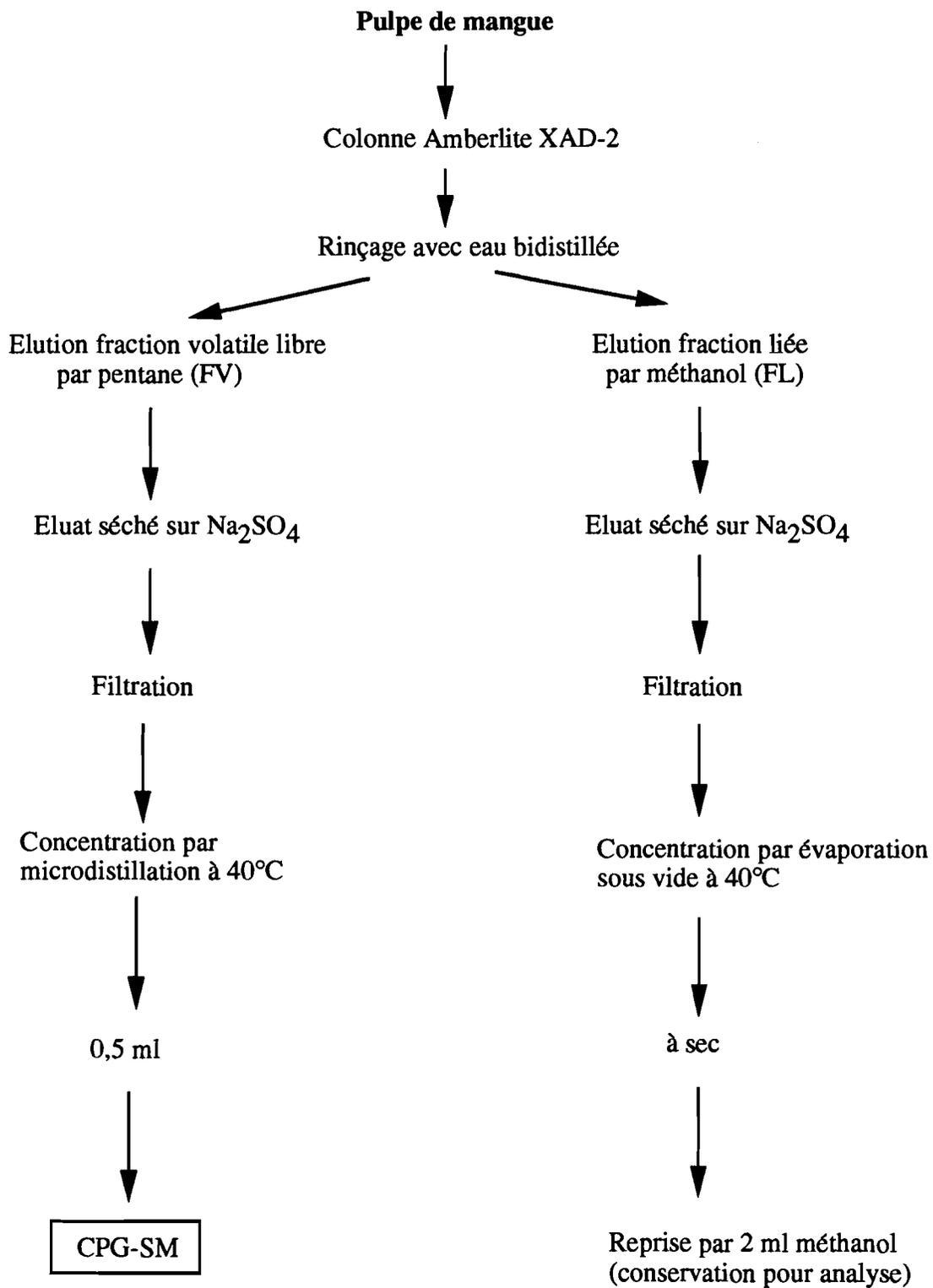
Une colonne de 30 cm de long et 2 cm de diamètre interne contenant 31,4 ml d'Amberlite XAD-2 est conditionnée successivement par 25 ml de méthanol, d'éther et d'eau bidistillée pour éliminer les impuretés résiduelles avant la percolation de 150 ml de jus clair ou de sérum à 4 ml/min. Le passage de 200 ml d'eau distillée permet d'éliminer les composés les plus polaires : sucres, acides et composés solubles dans l'eau.

La fraction volatile "libre" est éluée par 300 ml de pentane avant l'élution par 300 ml de méthanol de la fraction "liée" (les hétérosides).

#### **II-1-2-2 Fractionnement des hétérosides par chromatographie sur colonne de silice**

Nous obtenons une fraction liée brute après extraction sur Amberlite XAD-2 qu'il va falloir purifier et séparer. En effet, les hétérosides sont différents par la nature de la copule osidique et de l'aglycone, par conséquent différents au niveau de la taille de l'encombrement stérique et de la polarité.

La séparation doit être basée sur ces différentes propriétés. Ainsi nous avons utilisé la chromatographie liquide sur colonne de silice pour une première séparation.



**Figure 21** : Extraction des hétérosides sur colonne Amberlite XAD-2

L'extrait hétérosidique brut est déposé sur une colonne de 40 cm de long et 1,8 cm de diamètre intérieur contenant 35 g de gel de silice 60 mélangé au préalable à du chloroforme puis dégazé.

L'élution de la fraction liée est effectuée par les solvants suivants :

150 ml de chloroforme,

440 ml mélange chloroforme - acétonitrile - ammoniacque 32 %

(15 : 85 : 10, v/v/v)

660 ml mélange chloroforme - acétonitrile - ammoniacque 32 %

(12,5 : 87,5 : 12,5 v/v/v)

Des fractions de 8 ml sont collectées, analysées en CCM puis rassemblées de façon à constituer des fractions homogènes. Nous avons obtenu quatre fractions qui ont été évaporées à sec ; chaque résidu est repris par 2 ml de méthanol et conservé pour analyse au CCM, hydrolyse et identification.

## **II-2 Hydrolyse des hétérosides**

Afin d'identifier les oses et les aglycones constituant la fraction liée, une hydrolyse enzymatique et acide a été entreprise tant pour l'extrait brut que pour les sous-fractions obtenus après fractionnement sur gel de silice.

### **II-2-1 Hydrolyse enzymatique**

0,5 ml de substrat,

0,5 ml de tampon phosphate citrate (0,1 M) pH 5,

0,2 ml de solution enzymatique : pectinase d' *Aspergillus niger*.

La réaction enzymatique (Fig 22), 16 heures dans un bain-marie à 45°C est arrêtée en plongeant les tubes dans de l'eau glacée pendant 10 min. Un témoin sans enzyme est réalisé dans les mêmes conditions. Les aglycones libérés sont extraits au pentane et analysés en chromatographie en phase gazeuse et les oses en CCM.

### **II-2-2 Hydrolyse acide**

L'hydrolyse acide (Günata et *al.*, 1988) des hétérosides par l'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M (Fig 23) permet de libérer aussi les oses qui pourraient être identifiées en CCM ; quant aux aglycones ils sont susceptibles de subir un réarrangement en milieu acide.

## HYDROLYSE ENZYMATIQUE

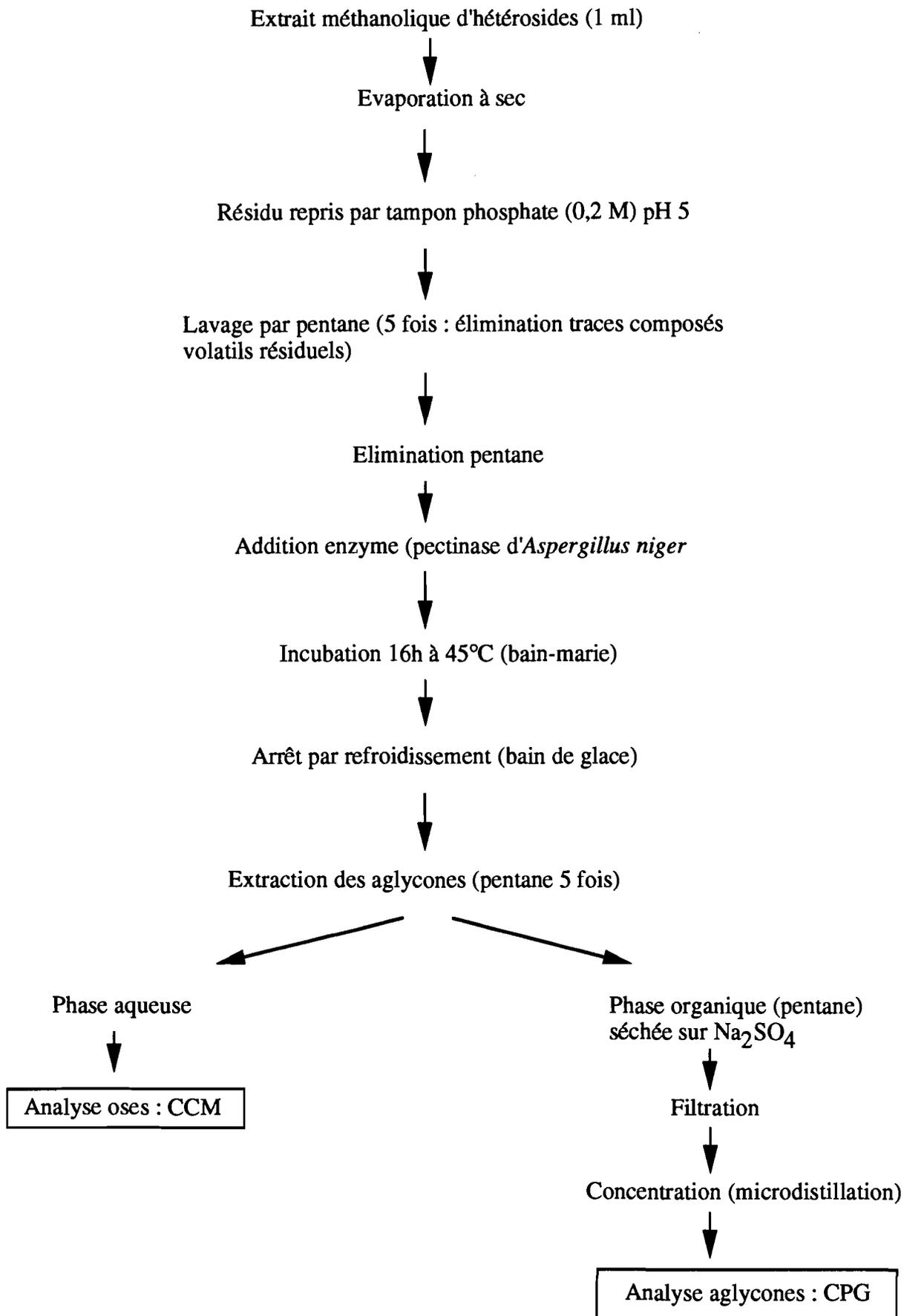


Figure 22 : Hydrolyse enzymatique de l'extrait hétérosidique de mangue

## HYDROLYSE ACIDE

T F A (2 M)

Extrait méthanolique d'hétérosides



Evaporation à sec



Résidu repris par tampon phosphate (0,2 M) pH 5



Lavage par pentane (5 fois : élimination traces composés volatils résiduels)



Elimination pentane



Addition acide Trifluoracétique (TFA) 2 M



Réaction (1h étuve à 120°C)



Arrêt réaction (sortie à température ambiante)



Extraction des aglycones (pentane 5 fois)



Phase aqueuse



Analyse oses : CCM

Phase organique (pentane)  
séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Filtration



Concentration (microdistillation)



Analyse aglycones : CPG

Figure 23 : Hydrolyse acide de l'extrait hétérosidique de mangue

0,5 ml de substrat,  
0,5 ml tampon phosphat citrate (0,1 M) pH 5  
0,2 ml TFA (2 M).

La réaction d'hydrolyse est réalisée à 120°C pendant 1 heure. Les aglycones libérés sont extraits au pentane puis concentrés après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et analysés en chromatographie en phase gazeuse et les oses en chromatographie sur couche mince.

## **II-3 Analyse des glycosides**

### **II-3-1 Composition en oses des glycosides**

#### **II-3-1-1 Analyse en chromatographie sur couche mince (CCM)**

C'est une méthode rapide permettant de mettre en évidence les oses après hydrolyse des hétérosides.

On dépose 2 à 20 µl de milieu réactionnel (selon la concentration) sur une feuille d'aluminium recouverte de gel de silice 60 (film de 0,2 mm d'épaisseur). Un mélange de solvant : acétate d'éthyle, isopropanol et eau (65 : 30 : 10 /v/v/v) permet l'élution dans une cuve en verre.

Après migration, séchage à température ambiante, les oses sont révélés par pulvérisation d'un révélateur spécifique des sucres : le NEDIAC (75 mg dans 45 ml de méthanol additionné de 1,5 ml d'acide sulfurique concentré).

Après 15 min à 120°C les oses apparaissent sous forme de taches colorées mauves, grises, roses selon leur nature.

#### **II-3-1-2 Dosage des oses neutres**

C'est la méthode de Harris et *al.* (1984) qui a été adoptée. Après hydrolyse en milieu acide, les oses constitutifs libérés quantitativement sont rendus volatils par transformation en acétates d'alditol. Un volume de 10 ml d'extrait hétérosidique correspondant à 20 ml de pulpe de mangue a été évaporé à sec, puis hydrolysé par 0,5 ml d'acide trifluoroacétique 2 M pendant 75 minutes à 120°C. L'acide est ensuite éliminé sous courant d'air (40°C) puis l'inositol (50 µg) est ajouté comme étalon interne et les échantillons sont amenés à sec sous courant d'air à nouveau. On ajoute alors 0,5 ml d'une solution de borohydrure de sodium dans de

l'ammoniaque 1 M et l'ensemble est laissé en contact 60 minutes à 60°C (réduction des oses). Ce temps écoulé, la réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml d'acétone et les échantillons sont évaporés à sec en vue de l'acétylation. Les résidus secs sont repris par 0,1 ml d'acide acétique, puis 0,5 ml d'acétate d'éthyle, 1,5 ml d'anhydride acétique et enfin 0,05 ml d'acide perchlorique (catalyseur). Les échantillons sont laissés 15 minutes à température ambiante, puis on rajoute 5 ml d'eau et 0,05 ml de 1-méthyl-imidazole (pour arrêter la réaction). Après obtention d'une phase homogène, les acétates d'alditol sont extraits par 0,5 ml de chloroforme. La phase chloroformique est lavée par 2 ml d'eau pure.

Les acétates d'alditol sont séparés sur une colonne capillaire de type DB-225 (L 30 m, d.i. 0,32 mm, épaisseur de phase 0,25 µm). Les conditions opératoires sont les suivantes :

- injection split (1/10), gaz vecteur hydrogène (65 kPa),
- injecteur et détecteur : 250°C,
- four : isotherme à 210°C.

Les facteurs de réponses sont calculés à l'aide d'une solution étalon d'acétates d'alditol témoins.

### **II-3-1-3 Analyse de structure des glycosides par perméthylation**

L'analyse structurale des hétérosides par perméthylation permet de déterminer la nature des formes cycliques furaniques ou pyraniques ainsi que la position des liaisons entre résidus osidiques. Dans un premier temps, les groupements hydroxyles libres des glycosides sont méthylés, puis ceux-ci sont hydrolysés, libérant ainsi un mélange d'oses partiellement méthylés que l'on peut séparer et estimer quantitativement par chromatographie en phase gazeuse après réduction et acétylation. Les groupements méthylés étant portés par les oxygènes non engagés dans des liaisons glycosidiques, on peut pour chaque résidu partiellement méthylé déterminer le nombre et la position des carbones impliqués dans une liaison glycosidique (Aspinall, 1982).

#### **La réaction de perméthylation**

Le principe de cette réaction est le suivant : les hydroxyles libres des hétérosides sont déprotonés par une base forte (ici le méthyl sulfonyle méthylure de sodium) et réagissent avec un agent alkylant (ici l'iodure de méthyle) pour former des éthers méthyliques (Fig 7). La méthode utilisée, est celle d'Hakomori (1964), décrite par Jansson et *al.* (1976) et adapté par Saulnier (1987) pour l'étude structurale des polysaccharides.

L'ensemble de ces opérations s'effectue dans une verrerie parfaitement propre et sèche et sous atmosphère d'azote, l'hydrure de sodium réagissant violemment avec l'eau. D'autre part,

en raison de la haute toxicité et de la corrosivité des réactifs (anion et iodure de méthyle), les manipulations sont conduites sous hotte aspirante avec des gants.

### *Préparation de l'anion du diméthyl sulfinyle*

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 1,6 g d'hydrure de sodium (NaH (80 % dans l'huile blanche, conservé sous vide sur anhydride phosphorique). L'erlenmeyer est bouché avec un bouchon à jupe rabattable et purgé avec de l'azote, on lave avec 3 x 20 ml de pentane ou d'éther de pétrole puis on sèche sous courant d'azote. On ajoute ensuite 25 ml de diméthyle sulfoxyde (DMSO) (déshydraté et conservé sur tamis moléculaires 4 Å sous atmosphère d'azote). L'erlenmeyer est ensuite placé dans un bain d'huile à 60-70°C avec agitation magnétique et sous courant d'azote pendant environ 2 heures. On obtient alors un anion de couleur vert kaki clair, qui peut être conservé au congélateur. L'anion ainsi préparé a une molarité d'environ 2 M, titrable par du méthanol anhydre en utilisant comme indicateur coloré quelques gouttes de triphénylméthane à 0,5 % dans le tétrahydrofurane (couleur rouge dans ces conditions).

### *Méthylation des échantillons*

La solution à analyser contenant 0,2 à 1 mg de glycosides, est concentrée jusqu'à 1 ml à l'évaporateur rotatif à 45°C.

L'extrait concentré est transvasé dans un pillulier de 5 ml et séché à sec sous courant d'azote. Le pillulier est bouché à l'aide d'une vanne en téflon (Hypo-Vial™, Mininer® Valve), puis purgé avec de l'argon. 0,5 ml de DMSO sont ajoutés sous agitation magnétique. Après dissolution complète de l'échantillon, 0,5 ml de la solution d'anion préparée ci-dessus sont ensuite additionnés et on purge de nouveau avec de l'argon avant de laisser en contact pendant deux heures sous agitation magnétique. Les pilluliers sont ensuite refroidis dans la glace, et 0,5 ml d'iodure de méthyle conservé sur copeaux d'argent à 4°C et à l'abri de la lumière sont ajoutés. Le mélange réactionnel, solidifié au froid, se liquéfie sous l'effet de la réaction exothermique entre l'iodure de méthyle et l'alkoxyde ; on laisse sous agitation magnétique à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 1 heure. Ce temps écoulé, les pilluliers sont mis sous un courant d'air pendant 15 min afin d'éliminer la plus grande partie de l'iodure de méthyle en excès. Une solution parfaitement limpide et incolore est obtenue. Le milieu est ensuite repris par 2 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) puis transféré dans des tubes à centrifuger avec bouchon à vis. Le DMSO et l'iodure de sodium sont éliminés par lavage avec 5 x 2 ml d'eau distillée. Après élimination de la phase aqueuse, la phase chloroformique contenant les glycosides perméthylés est amenée à sec sous un courant d'air en chauffant à 50°C.

### ***Hydrolyse des glycosides méthylés et dérivation***

Les fonctions éthers méthyliques sont stables en milieu acide, ce qui permet d'hydrolyser les hétérosides perméthylés sans perte d'information structurale.

Les échantillons sont hydrolysés complètement et les oses libérés sont dérivés selon le protocole décrit au paragraphe II-3-1-2, en veillant toutefois, lors des évaporations, à ne jamais chauffer au-delà de 40°C afin d'éviter la perte de certains éthers extrêmement volatils.

### ***Séparation et identification des acétates d'alditol méthylés***

La séparation des acétates d'alditol partiellement méthylés est réalisée à la fois sur une colonne capillaire de type DB-5 et de type DB-225 (L 30 m, d.i. 0,32 mm, épaisseur de phase 0,25 µm) afin de limiter les cas de coélutions. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- DB-5 : Injection « on-column », gaz vecteur hydrogène (120 kPa)  
injecteur et détecteur : 250°C  
four : isotherme à 145°C pendant 10 min, puis une montée (2°C/min) à 210°C.
- DB-225 : Injection en split (1/10), gaz vecteur hydrogène (65 kPa)  
injecteur et détecteur : 250°C  
four : isotherme à 170°C pendant 15 min, puis une montée (5°C/min) à 210°C.

L'identification des pics est réalisée à partir des tables de temps de rétention établies par Saulnier (1987) en méthylant différents polysaccharides de structures connues ainsi que par spectrométrie de masse.

Les pourcentages molaires de chaque acétate d'alditol partiellement méthylé sont calculés par rapport à la surface totale des pics identifiés ainsi que par famille d'oses en utilisant les surfaces de chaque pic corrigées par les facteurs de réponse établis par Sweet et *al.* (1975).

### **II-3-2 Les aglycones**

Après hydrolyse des hétérosides et extraction des aglycones libérés (Fig 22 et 23), l'identification est réalisée grâce à la chromatographie en phase gazeuse et au couplage CPG/SM en impact électronique.

- Chromatographie en phase gazeuse

Les composés sont séparés sur une colonne de type DB5. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

injection split (1/10), gaz vecteur hydrogène (débit sortie colonne 1,8 ml/min)

injecteur : 250°C

détecteur : 300°C

four : 40°C isotherme pendant 3 min suivi d'une programmation de 2°C/min jusqu'à 250°C, puis maintenu 15 min à la température finale

### II-3-3 Analyse des glycosides après dérivation

Les glycosides isolés par adsorption sur la résine Amberlite XAD-2 sont rendus volatils par trifluoroacétylation pour permettre leur analyse directement en CPG. Le protocole suivi est celui décrit par Voirin *et al.* (1992a).

La réaction de trifluoroacétylation doit avoir lieu dans des conditions rigoureusement anhydres.

Une partie aliquote de l'extrait glycosidique est additionnée de 10 µg de β-D-glucopyranoside de phényle comme étalon interne et concentrée jusqu'à sec sous courant d'azote à 60°C dans un réacti-vial® de 2 ml. Le résidu est repris dans 20 µl de pyridine et 20 µl de réactif MBTFA. Après agitation, le réactif- vial® est bouché hermétiquement sous azote et mis à 60°C pendant 20 min. Après refroidissement, les dérivés trifluoroacétylés sont séparés sur une colonne capillaire de type DB-5. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Conditions utilisées lors de l'analyse des hétérosides

DB5 (L 30 m, d.i. 0,25 mm, épaisseur de phase 0,25 µm)

Injection en split (1/10), gaz vecteur hydrogène (débit sortie de colonne 1,8 ml/min)

- injecteur : 280°C

- détecteur : 300°C

- four : 125°C à 220°C (3°C/min), puis de 220°C à 280°C (2°C/min), suivi d'un isotherme à 280°C (15 min).

L'identification des dérivés trifluoroacétylés est effectuée par comparaison des indices de rétention avec ceux obtenus pour des composés de référence ainsi que par spectrométrie de masse.

## II-4 Méthode d'identification des constituants avec le couplage CPG-SM

### II-4-1 Principe du couplage CPG-SM

Le couplage est un outil remarquable en chimie analytique pour l'étude d'une solution complexe de substances volatiles, car l'interprétation d'un spectre de masse permet dans de nombreux cas d'accéder à la structure d'une substance organique. Le spectre permet souvent d'affirmer rapidement si deux substances sont différentes ou si elles ont des chances d'avoir des structures proches ou identiques. Son autre trait essentiel est sa très grande sensibilité.

Le spectromètre de masse à filtre quadripolaire est utilisé dans la plupart des systèmes de couplage CPG-SM et les éléments essentiels qui le composent sont une source, un filtre quadripolaire et un détecteur (Fig 24).

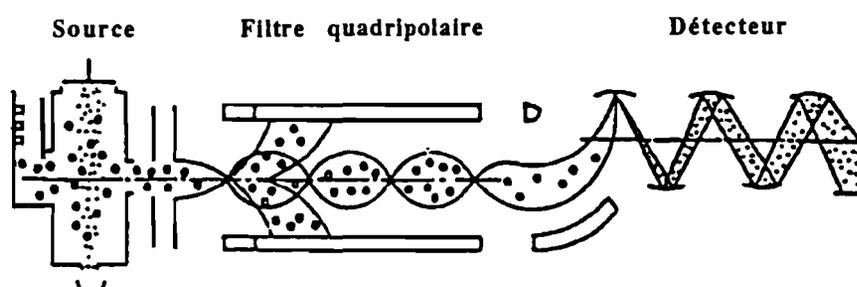


Figure 24 : Schéma d'un spectromètre de masse à filtre quadripolaire.

Les molécules vaporisées, séparées par le chromatographe arrivent dans la source, dans laquelle elles peuvent être ionisées de différentes façons. Dans le cas du couplage CPG-SM, l'ionisation est obtenue soit par impact électronique, soit par ionisation chimique.

Les ions sont ensuite accélérés et envoyés dans l'analyseur quadripolaire, lequel a pour rôle de séparer les ions formés en fonction du rapport de leur masse à leur charge (les espèces neutres ou les radicaux libres ne peuvent pas être analysés). En effet, un champ électrostatique est maintenu entre quatre barreaux cylindriques en appliquant une tension continue et une tension de radiofréquence. Les ions oscillent dans le champ délimité par les barreaux et seuls les ions d'un rapport  $m/z$  défini par les amplitudes des tensions appliquées suivent une trajectoire stable et sont collectés par le détecteur.

Dans la plupart des cas, le détecteur est un multiplicateur d'électrons constitué par une chaîne de dynodes en cuivre-béryllium. Il permet de convertir le courant d'ions en un signal électrique, qui est ensuite amplifié et traité.

### *L'impact électronique*

Les électrons émis par un filament chauffé forment un faisceau d'électrons de forte énergie (70 eV) qui se dirige vers la source où règne un vide poussé ( $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  torr). La rencontre d'un électron de haute énergie avec un analyte forme un ion moléculaire  $M^+$  susceptible de se décomposer spontanément selon des cinétiques de premier ordre.

### *L'ionisation chimique*

Le terme ionisation chimique recouvre aujourd'hui plusieurs types de réactions ions-molécules relativement différentes par leurs mécanismes. Le trait commun de ces réactions est de produire, dans un plasma, des cations ou des anions en phase gazeuse dérivés d'un analyte. Le plasma est obtenu par ionisation d'un gaz neutre, présent en large excès par rapport à l'analyte, le rapport molaire étant généralement de  $10^3$  à  $10^4$ .

La nature et les abondances des ions dérivant de l'analyse dépendent de certaines conditions opératoires : température du bloc source, pression du gaz neutre, tension des plaques d'extraction, état de propreté des surfaces et nature de l'échantillon et du gaz réactif.

## **II-4-2 Conditions d'analyse avec un mode d'ionisation par impact électronique**

### **Couplage avec Automass 020**

Cet appareillage a été utilisé pour l'identification des aglycones séparés sur une colonne de type DB5MS (L 30 m, d.i. 0,25 mm, épaisseur de phase 0,25  $\mu$ m) et des acétates d'alditol partiellement méthylés. L'injection se fait en mode split (1/20) et le gaz vecteur est l'hélium. Les conditions utilisées de programmation du four et de débit du gaz vecteur pour ces deux familles de substances sont identiques à celles décrites précédemment pour chacune d'elles. L'interface chromatographe-spectromètre est maintenue à une température de 250°C. L'énergie d'ionisation appliquée est 70 eV. Lors de l'analyse, nous utilisons une gamme de masse de 35 à 250 uma (unité de masse atomique).

L'analyse des spectres des composés volatils est réalisée à l'aide d'une bibliothèque renfermant plus de 8000 spectres (INRAMASS), constituée par le Laboratoire des Arômes de l'INRA de Dijon, et de la bibliothèque Wiley.

### **II-4-3 Conditions d'analyse avec un mode d'ionisation chimique**

Ce mode d'ionisation est réalisé avec le spectromètre de masse MS Engine 5989 A. Il est utilisé pour l'analyse structurale des glycosides trifluoroacétylés. Les conditions chromatographiques employées, permettant la séparation des constituants avant leur ionisation dans la source, sont les suivantes :

- injecteur : 110°C à 260°C (60°C/min) et un isotherme à 260°C pendant 50 min ;
- four : 125°C à 290°C à raison de 3°C/min.

L'interface chromatographe-spectromètre est maintenue à une température de 290°C lors de l'analyse. L'énergie d'ionisation appliquée est de 70 eV, tandis que le domaine de masse est de 60 à 600 uma.

Quant aux conditions d'ionisation chimique ayant un rôle important, elles sont les suivantes :

- gaz modérateur : méthane
- pression et température dans la source : 0,6 torr et 200°C
- courant d'émission et énergie d'ionisation : 350  $\mu$ A et 200 eV
- potentiel du « repeller » : 7 V.

### **II-5 Synthèse du $\beta$ -D-glucopyranoside de furanéol**

La méthode utilisée est celle décrite par Mayerl et *al.* (1989), elle peut être séparée en deux étapes : condensation et méthanolyse (Fig 25).

#### **Condensation**

Dans un pillulier muni d'un bouchon de téflon contenant 2,56 ml d'une solution de potasse (KOH 2,56 mMol) dans de l'éthanol 1N préchauffé à 80°C, on introduit 0,34 g (2,66 mMol) de furanéol après purge et agitation sous azote. Toujours sous azote, on ajoute goutte à goutte pendant 10 min, une solution de 1 g (2,44 mM) d' $\alpha$ -bromoglucose tétraacétylé dans 1 ml de toluène. Après 30 min d'agitation à température ambiante, la solution prend une couleur orange et a un pH 5. Le milieu réactionnel est versé dans un autre pillulier contenant de la glace, ensuite on procède à l'extraction du produit par du chloroforme, suivie d'un lavage de la phase organique avec de l'eau pure jusqu'à pH neutre. Le produit sera séché sur sulfate de sodium anhydre et concentré à sec sous vide à 35°C.

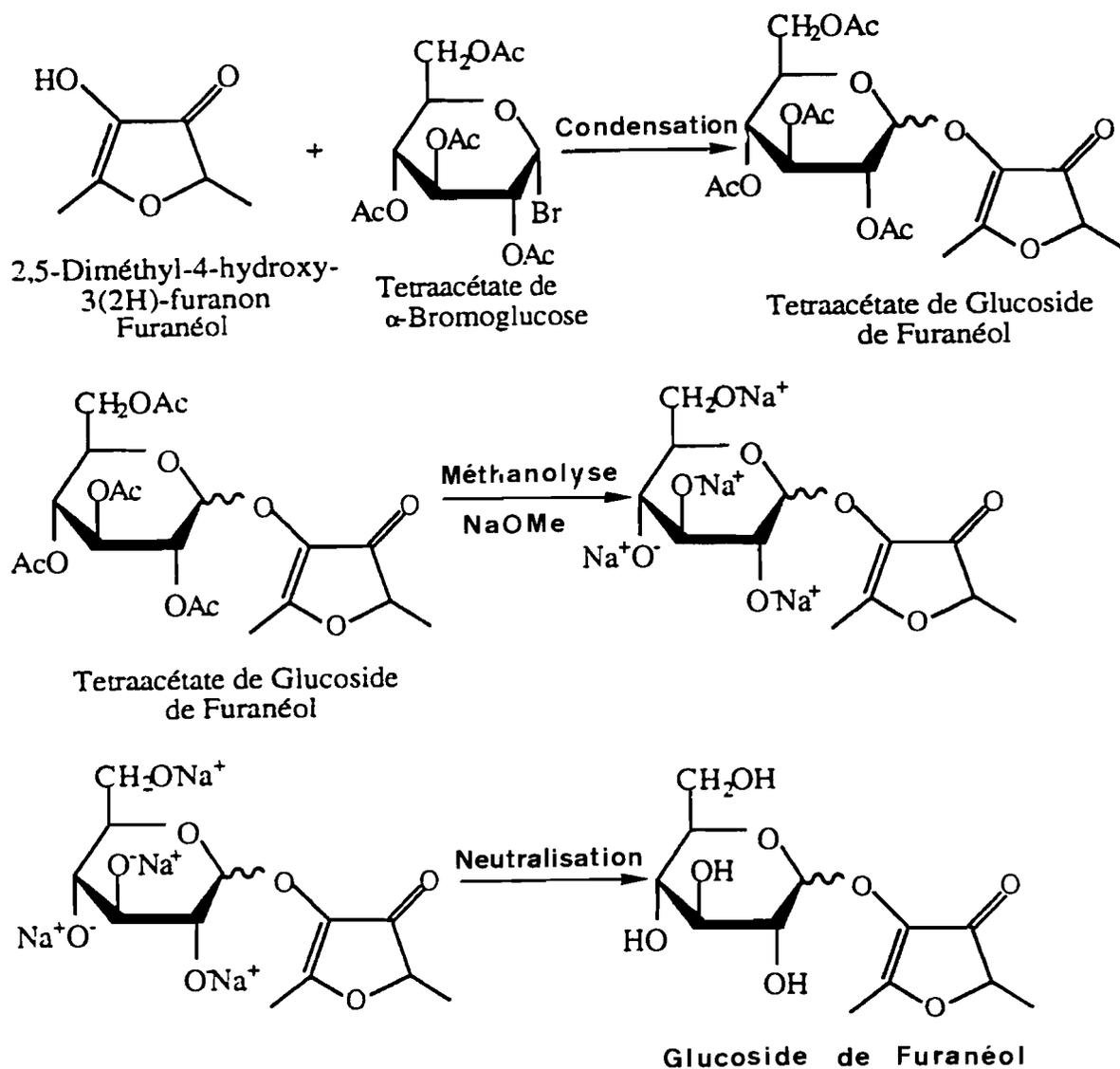


FIGURE :25 Synthèse du glucoside de furanéol

Avant la concentration à sec, le résidu peut être chromatographié sur colonne de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (6:4 ; v/v) pour éliminer l'excès de furanéol et de réactif bromé hydrolysé au cours de la condensation.

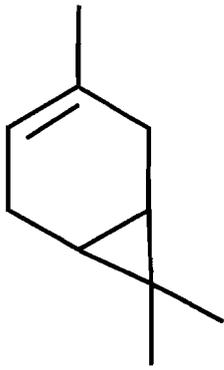
### **Méthanolyse**

L'extrait concentré est repris par 6,25 ml de méthanol. Après addition lente de 3,75 ml d'une solution de méthylate de sodium dans du méthanol (0,290 Mol/l), on laisse agir à température ambiante pendant 4 heures en suivant la réaction par CCM avec l'éluant acétate d'éthyle/éthanol (3:1, v/v). Lorsque le produit peracétylé a disparu, le milieu réactionnel est neutralisé avec de l'acide hydrochlorique puis concentré à sec sous vide à 35°C.

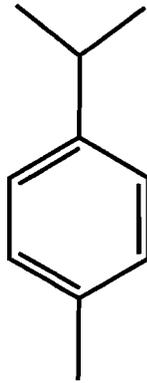
Le produit obtenu a un rendement de 1,5 à 2 % et a été vérifié par comparaison des données chromatographiques et spectrales avec celles de la littérature comme étant du glucoside de furanéol.

## Annexe 2

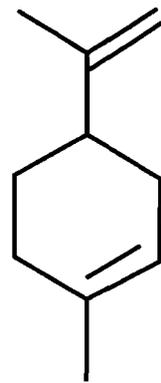
### Monoterpènes identifiés dans la pulpe de mangue



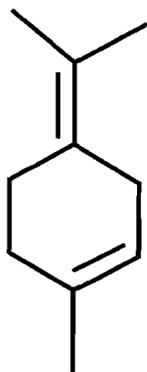
Car-3-ène



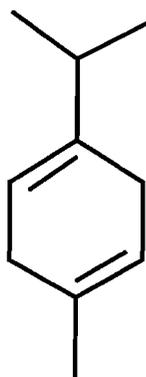
P-cymène



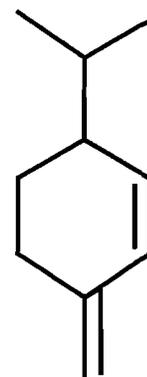
Limonène



Terpinolène



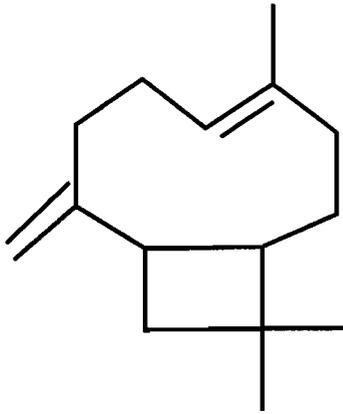
γ-terpinène



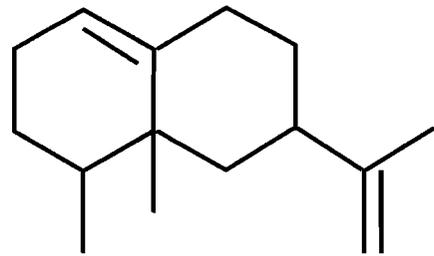
β-phellandrène

### Annexe 3

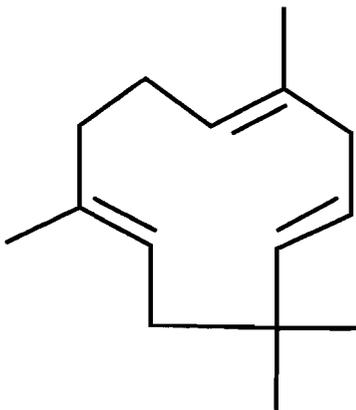
#### Sesquiterpènes identifiés dans la pulpe de mangue



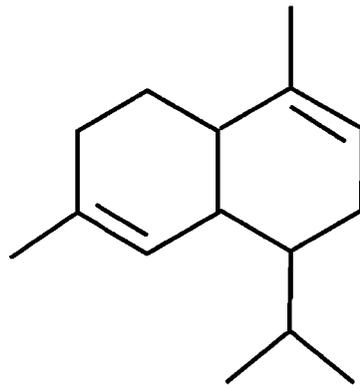
$\beta$ -caryophyllène



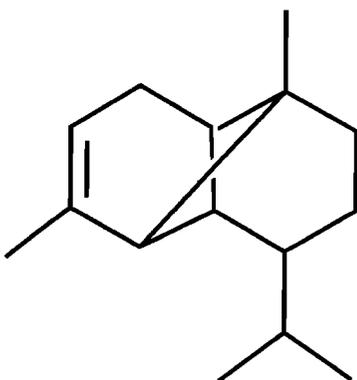
Eremophyllène



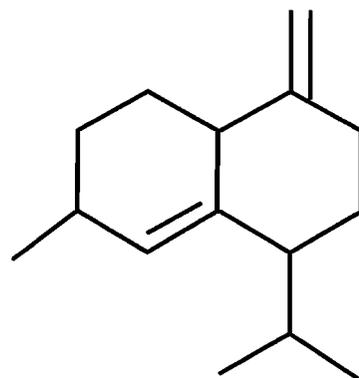
$\alpha$ -humulène



$\alpha$ -muurolène



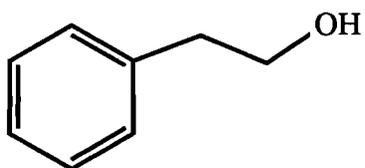
$\alpha$ -copaène



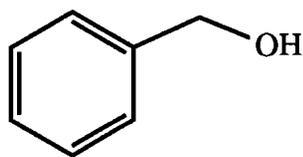
$\gamma$ -cadinène

## Annexe 4

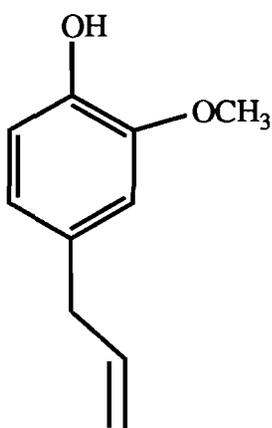
### Alcools identifiés comme aglycones dans la pulpe de mangue



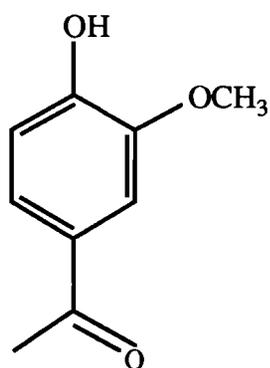
2-phényléthanol



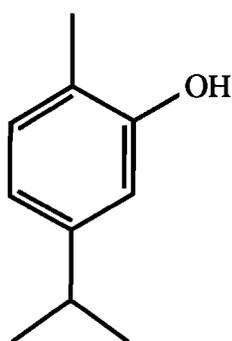
Alcool benzylique



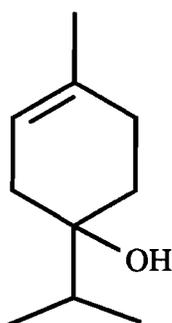
Eugénol



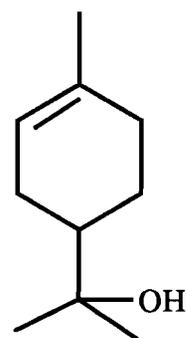
Vanilline



Carvacrol



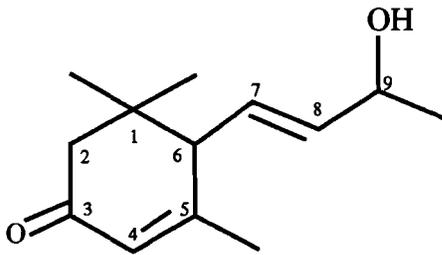
Terpinèn-4 ol



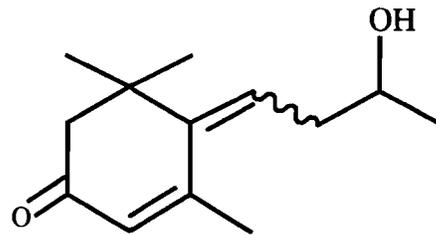
$\alpha$ -terpinéol

## Annexe 5

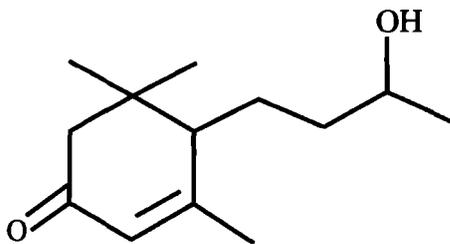
### Composés norisoprénoïdes en C<sub>13</sub> identifiés comme aglycones dans la pulpe de mangue



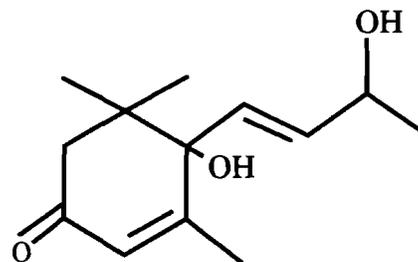
**3-oxo- $\alpha$ -ionol**  
ou 9-hydroxy mégastigma-4,7-diène-3-one



**3-oxo-retro- $\alpha$ -ionol**  
ou 9-hydroxy mégastigma-4,6-diène-3-one

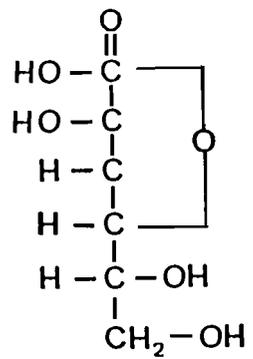


**3-oxo-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol**  
ou 9-hydroxy mégastigma-4-en-3-one

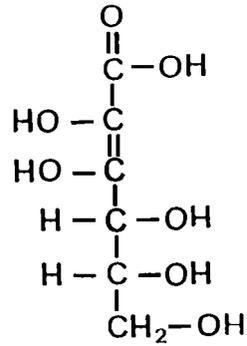
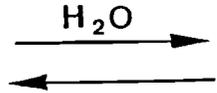


**Vomifoliol**

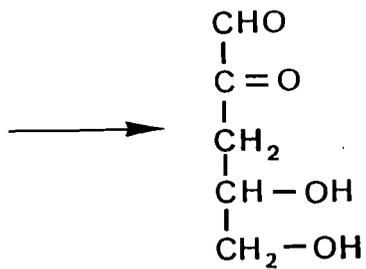
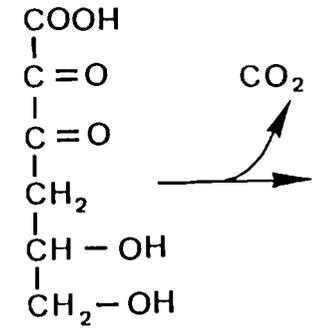
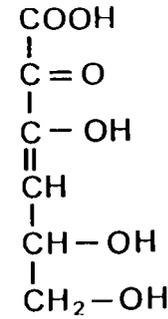
Annexe 6



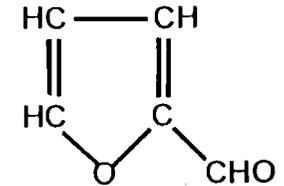
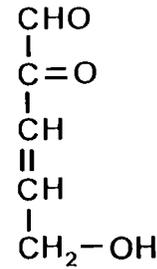
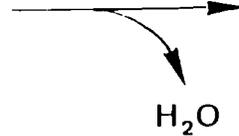
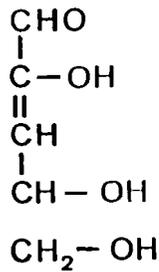
Acide ascorbique



Acide 2-cétogulonique  
(forme énolique)



3-désoxy-L-pentosone



Furfural

Dégradation anaérobie de l'acide ascorbique ( Cheftel et Cheftel , 1979 ).

Annexe 7

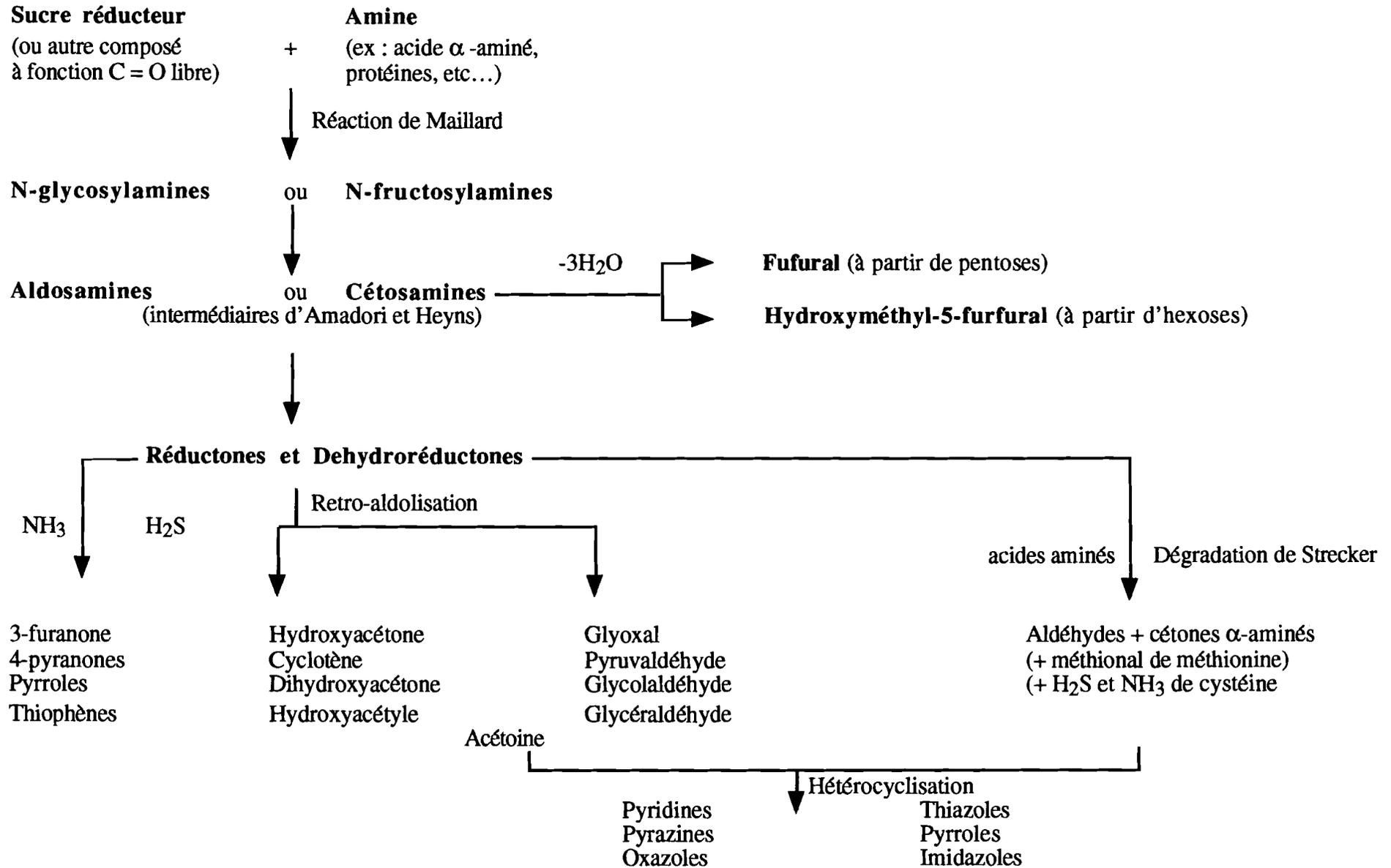
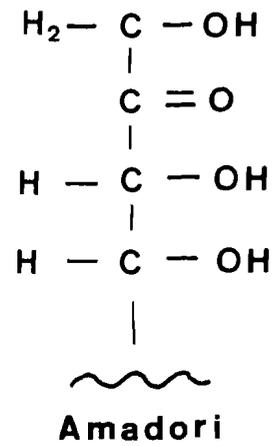
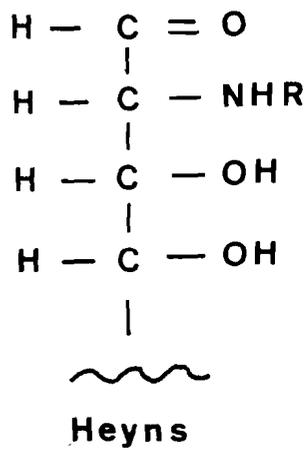
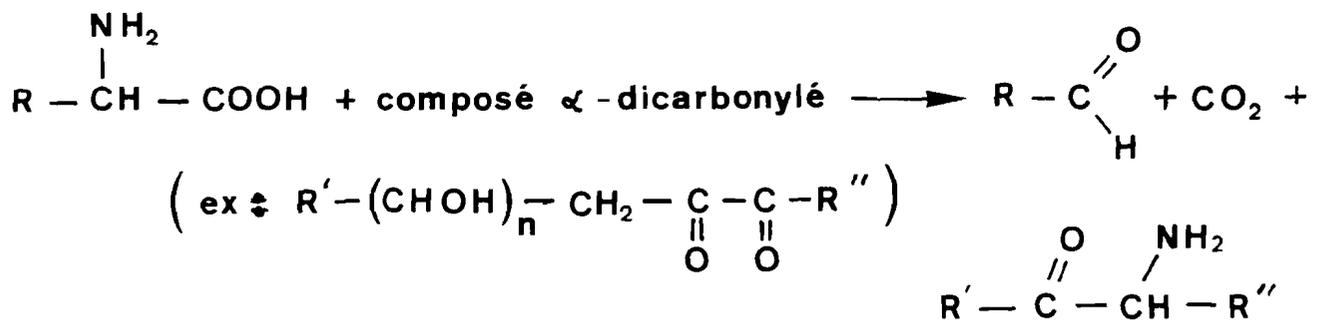


Schéma de formation de composés au cours de traitement thermique : réaction de Maillard (Parliment, 1989)

Annexe 8



Intermédiaires d'Amadori et Heyns.



Dégradation de Strecker d'un acide aminé.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDEL BAKI M., ASKAR A., EL SAMAKY S.K., ABDEL FADEEL M.G., 1981. Studies on mango flavor. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **4**, 139-142.
- ACKERMAN L.G.J., TORLINE P.A., 1984. Volatile components in the headspace of eight mango cultivars. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **17**, 339-341.
- ADEDEJI J., HARTMAN T.G., ROSEN R.T. et HO C.T., 1991. Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombim* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1494-1497.
- ADEDEJI J., HARTMAN T.G., LECH J. et HO C.T., 1992. Characterization of glycosidically bound aroma compounds in the african mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 659-661.
- ALBERSHEIM P., NEVINS D.J., ENGLISH P.D., KARR A., 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, **5**, 340-345.
- AMMU K., KRISHNAPPA K.G., SUBRAMANIAN V., SHARMA T., R. NATH H., 1976. Freeze drying of mango pulp. *Food Technol. Austr.*, **28**, 339-341.
- ANGELINI P., BANDYOPADHYAY C., RAO B.Y.K., GHOPLAP A.S., BAZINET M.L., 1973. Studies on aroma of ripe mango pulp : identification of aroma bearing compounds. Abst. 366, 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Institute of Food Technology, Miami Beach, Fl.
- Anonyme, 1996. Mangoes. In FAO Production Yearbook. 49, 164-165.
- ASKAR A., GIERSCHNER K.H., SILIHA H., EL ZOGHBI M., 1990. Polysaccharides and cloud stability of tropical nectars. Proceedings XX th Symposium of the International Federation of Fruit Juice Producers. (Ed.) Kädig Druck AG, Zug, pp. 207-223.
- ASPINALL G.O., 1982. Chemical characterisation and structure determination of polysaccharides. In the Polysaccharides, vol. 1 (Eds.) Aspinall G.O., Academic Press, London & New York, pp. 35-129.
- BAKER R.A., BRUEMMER J.H., 1972. Pectinase stabilization of orange juice cloud. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1169-1173.
- BALTENWECK-GUYOT R., TRENDEL J.M., ALBRECHT P., SCHAEFFER A., 1996. Mono- and diglycosides of (E)-6,9-dihydroxymegastigma-4,7-dien-3-one in *Vitis vinifera* wine. *Phytochemistry*, **43**, 621-624.

- BANDYOPADHYAY C., GHOLAP A.S., 1973. Relationship of aroma and flavour characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) to fatty acid composition. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1497-1503.
- BARON A., 1990. Quelques emplois de polyosidases dans l'industrie des fruits et légumes. Liquéfaction et macération. *Rev. Fr. Oenol.*, **122**, 21-27.
- BARTLEY J.P., SCHWEDE A., 1987. Volatile flavor components in the headspace of the Australian or "Bowen" mango. *J. Food Sci.*, **52**, 353-355.
- BAUMES R., DUGELAY I., GÜNATA Y.Z., TAPIERO C., BITTEUR J., BAYONOVE C., 1993. Analyse structurale de quelques glycosides de raisin. In : *Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins*. Bayonove C., Crouzet J., Flanzky C., Martin J.C., Sapis J.C.. (Eds.) *Rev. Fr. Oenol. Montpellier*. pp. 90-98.
- BAUMES R.L., AUBERT C.C., GÜNATA Z.Y., DE MOOR W., BAYONOVE C.L., TAPIERO C., 1994. Structures of two C<sub>13</sub> norisoprenoïd glucosidic precursor of wine flavor. *J. Essent. Oil Res.*, **6**, 587-599.
- BJORNDAL H., HELLERQVIST C.G., LINDBERG B., SVENSON S., 1970. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **9**, 610-619.
- BLAIR J.S., GODAR E.M., MASTERS J.E., RIESTERS D.W., 1952. Exploratory experiments to identify chemical reaction causing flavor deterioration during storage of canned orange juice. Incompatibility of peel-oil-constituents with the acid juice. *Food Res.*, **17**, 235-260.
- BOURQUELOT E., BRIDEL M., 1913. Synthèse du géranylglucoside  $\beta$  à l'aide de l'émulsine ; sa présence dans les végétaux. *C.R. Acad. Sci.*, **157**, 72-74.
- BREKKE J.E., CAVALETTO C.G., STANFORD A.E., 1968. Mango puree processing *Hawai Agric. Exp. Station. Tech. Progress Report*, **167**, 10.
- BREKKE J.E., CHAN H., CAVALETTO C.G., 1972. Papaya puree : a tropical flavor ingredient. *J. Food Prod. Dev.*, **6**, 36-37 .
- BRILLOUET J.M., GÜNATA Z., BITTEUR S., CORDONNIER R., BOSSO C., 1989. Terminal apiose : a new sugar constituent of grape juice glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 910-912.
- BRILLOUET J.M., SAULNIER L., MOUTOUNET M., 1990. Les polysaccharides pectiques et les enzymes de dégradation. *Rev. Fr. Oenol.*, **122**, 43-54.

- BUTTERY R.G., TAKEOKA G., TERANISHI R., LING L.C., 1990. Tomato aroma components : identification of glycoside hydrolysis volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 2050-2053.
- CANTARELLI C., RAZZARI F., 1978. Alternative fruit juices processes. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **11**, 94-102.
- CASIMIR D.J., KEFFORD J.F., WHITFIELD F.B., 1981. Technology and flavor chemistry of passion fruit juices and concentrates. *Adv. Food Res.*, **27**, 243-295.
- CHAIROTE G., 1980. Contribution à l'étude des constituants volatils de l'abricot « Rouge du Roussillon ». Thèse de 3e cycle, Université de Montpellier II.
- CHAIROTE G., RODRIGUEZ F., CROUZET J., 1981. Characterization of additional volatile flavor components of apricot. *J. Food Sci.*, **46**, 1898-1906.
- CHALIER P., 1987. Isolement et hydrolyse enzymatique des hétérosides terpéniques de l'abricot. D.E.A. Sciences Alimentaires , Université Montpellier II, France.
- CHAN H.T. jr, FLATH R.A., FORREY R.R., CVALETTI C.G., NAKUYAMA T.O.M., BREKKE J.E., 1973. Development of off-odors and off-flavors in papaya puree. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 566.
- CHASSAGNE D., CROUZET J., BAUMES R.L., LEPOUTRE J.P., BAYONOVE C.L., 1995. Determination of trifluoroacetylated glycosides by gas chromatography coupled to methane negative chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **694**, 441-451.
- CHASSAGNE D., 1996. Les glycosides précurseurs d'arôme du fruit de la passion : étude structurale et hydrolyse enzymatique. Thèse de Doctorat Université Montpellier II, France.
- CHASSAGNE D., CROUZET J., BAYONOVE C., BRILLOUET J.M., BAUMES R., 1996. 6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit. *Phytochemistry*, **60**, 1497-1500.
- CHEFTEL J.C., CHEFTEL H., 1977. In : Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, vol 1 (Ed.) Technique et Documentation - Lavoisier Paris, pp. 209-236.
- COBB W.Y., 1969. Quantification of flavorful food components using isotope dilution. *J. Food Sci.*, **34**, 466-469.
- CORDONNIER R., 1956. Recherches sur l'aromatization et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur. *Ann. Technol. Agric.*, **1**, 75-100.

- CORDONNIER R. E., BAYONOVE C.L., 1974. Mise en évidence dans le raisin variété "Muscat d'Alexandrie", de monoterpènes liés, révélables par plusieurs enzymes de fruit. *C.R. Acad. Sci.*, **278**, 3387-3390.
- CORDONNIER R.E., GÜNATA Y.Z., BAUMES R.L., BAYONOVE C.L., 1989. Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **23**, 7-23.
- CROTEAU R., MARTINKUS C., 1979. Metabolisme of monoterpene. Demonstration of (+)-neomenthyl- $\beta$ -D-glucoside as a major metabolite of (-)-menthone in peppermint (*Mentha piperata*). *Plant. Physiol.*, **64**, 169-175.
- CROUZET J., CHAIROTE G., RODRIGUEZ F., SECK S., 1983. Volatile components modification during heat treatment of fruits juices. In : Instrumental Analysis of Food vol.2, Charalambous G. et Inglett G. (Ed.) Academic Press Orlando, pp. 119-135.
- de LAROUSSILHE F., 1980. Multiplication du manguier. In : *Le manguier*. de Laroussilhe F. (Ed.) MAISONNEUVE et LAROSE, Paris, pp. 95-105.
- DEMOLE E., BERTHET D., 1971. Identification de la damascenone et de la  $\beta$ -damascone dans le tabac Burley. *Helv. Chim. Acta*, **54**, 681-682.
- DIAZ N, 1976. Estudio preliminar sobre los componentes del sabor y aroma de cuatro variedades de mango. *Ann. Congr. Am. Soc. Hort. Sci.*, **24**, 115-129.
- DIAZ N.A., 1980. Preliminary study on the flavor and aroma components of four mango varieties. *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, **64**, 357-362.
- DIECKMANN R.H., PALAMAND S.R., 1974. Autoxydation of some constituents of hops. I. The monoterpene hydrocarbon myrcene. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 498-503.
- DIMITRIADIS E., WILLIAMS P.J., 1984. The development and use of rapid analytical technique of estimation of free and potentially volatil monoterpene flavorants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **35**, 66-71.
- DOUGHTERY R.M., 1971. Taste panel response to flavor of heated mango puree. *Proc. Florida State Hort. Soc.*, **84**, 250.

- DOUSSE R., LÜTHI H.R., 1976. Fondements et expériences récentes en matière d'extraction de jus de fruits par diffusion. VIII Congrès International des Jus de Fruits. (Ed.) Juris Druck & Verlag Zurich 1977, pp. 53-70.
- ENGEL K. H., TRESSL R., 1983a. Studies on the volatile components of two mango varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 796-801.
- ENGEL K. H., TRESSL R., 1983b. Formation of aroma components from non volatile precursors in passion fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 998-1002.
- ERICKSSON C.E., 1979. Review of biosynthesis of volatiles in fruits and vegetables since 1975. In progress in flavour research. Applied Sci. Publ. Ltd., London pp. 159.
- ESSAIED M.H., 1985. Mise en évidence d'hétérosides précurseurs d'arôme chez la mangue et l'abricot. D.E.A. Sciences Alimentaires, Université Montpellier II, France.
- FABRE J., AMBID C., 1988. Traitement enzymatique des glycosides de fleurs de *Jasminium grandiflorum*. Application à l'obtention de bioessences. 7e Journées Internationales des Huiles Essentielles. Digne. pp. 71-76.
- FONTVIELLE M.J., 1989. Etude des glycosides terpéniques du fruit de la passion. D.E.A. Sciences Alimentaires, Université Montpellier II, France.
- FRANCIS M.J.O., ALLCOCK C., 1969. Geraniol  $\beta$ -O-glucoside, occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochemistry*, **8**, 1339-1347.
- GHOLAP A.S., BANDYOPADHYAY C., 1975. Comparative assessment of aromatic principles of ripe Alphonso and Langra mango. *J. Food Sci.Tech. (India)*, **12**, 262-263.
- GHOLAP A.S., BANDYOPADHYAY C., 1977. Characterisation of green aroma of raw mango (*Mangifera indica* L.). *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 885-888.
- GHOLAP A.S., BANDYOPADHYAY C., 1980. Fatty acid biogenesis in ripening mango (*Mangifera indica* L., var. Alphonso). *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 839-841.
- GHOLAP A.S., BANDYOPADHYAY C., 1984. Characterisation of mango like aroma in curcuma amada Roxb. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 57-59.
- GRAMPP D., 1969. Use of enzymes in food industry. *Deutsche Lebensm. Rundsch.*, **65**, 343-347.
- GRAMPP E., 1972. Die Veränderung der Technologie am Beispiel der Obst und Gemüseverarbeitung mit einem speziellen Pektinasepräparat. *Dechema-Monographien*, **70**, 175-186.

- GÜLDNER A., WINTERHALTER P., 1991. Structures of two new ionone glycosides from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2142-2146.
- GÜNATA Y.Z., 1984. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme de raisin : importance des terpénylglycosides, action des glycosidases. Thèse de Docteur-Ingénieur de l'Université Montpellier II, France.
- GÜNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., BAUMES R.L., CORDONNIER R., 1985. The aroma of grapes : extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grapes aroma components. *J. Chromatogr.*, **331**, 83-90.
- GÜNATA Y.Z., BITTEUR S., BRILLOUET J.M., BAYONOVE C., CORDONNIER R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.*, **184**, 139-149.
- GÜNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., TAPIERO C.L., CORDONNIER R.E., 1990. Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1232-1236.
- GUO W., SAKAT K., WATANABE N., NAKAJIMA R., YAGI A., INOR K., LUOS S., 1993. Geranyl 6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated as an aroma precursor from tea leaves for oolong tea. *Phytochemistry*, **33**, 1373-1375.
- HAKOMORI S.I., 1964. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methyl sulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, **55**, 205-208.
- HARRIS P.J., HENRY R.J., BLAKENEY A.B., STONE B.A., 1984. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **127**, 59-73.
- HARTMAN-SCHREIER J., SCHREIER P., 1987. Properties of  $\beta$ -glucosidase from *Carica papaya* fruit. *Food Chem.*, **26**, 201-212.
- HATTON T.T., REEDER W.F., 1966. Proc. Carrib. Am. Soc. Hort. Sci., 10-114.
- HE Z.D., WEDA S., AKAJI M., FUJITA R., INOUE K., YOUNG C.R., 1994. Monoterpenoid and phenylethanoïd glycosides from *Ligustrum pedunculare*. *Phytochemistry*, **36**, 709-716.
- HEIDLAS J., LEHR M., IDSTEIN H., SCHREIER P., 1984. Free and bound terpene compounds in papaya (*Carica papaya* L.) fruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1020-1021.
- HERDERICH M., FESER W., SCHREIER P., 1992. Vomifoliol 9-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-6-O- $\beta$ -D-glucopyranoside trisaccharide glycoside from apple fruit. *Phytochemistry*, **31**, 895-897.

- HOCHMANNOVA J., NOVOTNY L., HEROUT V., 1962. Hydrocarbons from *Petasites albus* rhizomes ; sesquiterpenic hydrocarbons from rhizomes of *Petasites officinalis*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 1711-1870.
- HUIYING L., SHOZHEN L., Mc CABE T., CLARDY J., 1984. A new monoterpene glycoside of *Paeonia lactiflora* . *Planta Medica*, 501-504.
- HUMPF H.U., SCHREIER P., 1991. Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1830-1832.
- HUNTER G.I.K., BUČEK W.A., RADFORD T., 1974. Volatile components of canned Alphonso mango. *J. Food Sci.*, **39**, 900-903.
- IDSTEIN H., SCHREIER P., 1983. Change of volatiles during maceration and liquefaction of selected tropical fruits. *Euro Food Chemistry II*, Roma.
- IDSTEIN H., SCHREIER P., 1985. Volatile constituents of Alphonso mango (*Mangifera indica*). *Phytochemistry*, **24**, 2313-2316.
- ISHII S., YOKOTSUKA T., 1975. Purification and properties of pectin lyase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 313-321.
- ISOE S., HYEON S.B., SAKAN T., 1969. Photo-oxygenation of carotenoids. I. The formation of dihydroactinidiolide and  $\beta$ -ionone from  $\beta$ -carotene. *Tetrahedron Letters*, **4**, 279-281.
- ITOKAWA H., OSHIDA Y., IKUTA A., INATOMI H., IKEGAMI S., 1981. Flavonol glycosides from the flowers of *Cucurbita pepo* . *Phytochemistry*, **20**, 2421-2422.
- JAKOB M., HIPPLER R., LÜTHI H.R., 1973. Über den einfluss pektolytischer Enzympräparate auf das Aroma von Apfelsaft. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **6**, 138-141.
- JANSSON P.E., KENNE L., LIEDGREN H., LINDBERG B., LONOGREN J., 1976. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chem. Commun. Univers. Stochkolm*, **8**, 1-20.
- JENNINGS W.G., WOHLER R., LEWIS M.J., 1972. Gas chromatographic analysis flavor and fragrance volatile by glass capillary gas chromatography. Academic Press, New York.
- JENNISKENS L.H.D., VORAGEN A.G.J., PILNIK W., MAARTEN A.P., 1991. Effects of treatment of apple pulp with liquefying enzymes on the aroma of apple juice. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **24**, 86-92.
- JUNGALWALA F.B., CAMA H.R., 1963. Carotenoïds in mango. *Indian J. Chem.*, **1**, 36-40.

- KARLSSON-EKSTROM G., VON SYDOW E., 1973. The aroma of black curants. VII. The influence of some processing parameter on the aroma of black-curants. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **6**, 165-169.
- KAZENIAC S.J., HALL R.M., 1970. Flavor chemistry of tomato volatile. *J. Food Sci.*, **35**, 519-530.
- KELEMEN M.V., WHELAN W.J., 1966. Inhibition of glucosidases and galactosidases by polyols. *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 423-428.
- KHODA H., KASAI R., YAMSAKI K., MURAKAMI K., TANAKA D., 1976. New sweet diterpene glycosides from *Stevia rebandiana*. *Phytochemistry*, **15**, 981-983.
- KHONOSHIMA T., SAWADA T., 1982. Legume saponins of *Gleditsia japonica* Miquel. V.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectral studies on the structures of *Gleditsia saponins* D<sub>2</sub>G and I. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4082-4087.
- KHONOSHIMA T., SAWADA T., 1984. Studies on the constituents of leguminous plants. VI. The structure elucidation of monoterpene glycosides from fruits of *Gymnocladus chinensis* Baillon. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2617-2621.
- KIMURA K., NISHIMURA H., IWATA I., MIZUTANI J., 1983. Deterioration mechanism of lemon flavor. 2- Formation of off-odor substances arising from citral. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 801-804.
- KIRCHNER J.G., MILLER J.M., 1953. Volatile oil constituents of grape fruit juice. *J. Agric. Food Chem.*, **1**, 510-514.
- KODOMA H., 1986. GC-MS methods for tobacco constituents. (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 277-248.
- KOULIBALY A., 1989. Etude qualitative des composés volatils de six variétés de mangues africaines. Mesure du potentiel aromatique. Isolement et hydrolyse acide des hétérosides terpéniques. Thèse de Doctorat, 3ème cycle, Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée (ISFRA), Bamako, Mali.
- KOULIBALY A., SAKHO M., CROUZET J., 1992. Variability of free and bound volatile terpenic compounds in mango. *Lebensm. Wiss. u. -Technol.*, **25**, 374-379.
- KROP J.J.P., PILNIK W., 1974. Cloud loss studies in citrus juices : cloud stabilization by a yeast-polygalacturonase. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **7**, 121-124.
- LATRASSES A., 1982. Qualité aromatique de la framboise (*Rubus idaeus* L.) II. Interprétation de l'indice d'arôme. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **15**, 49-51.

- LOEILLET D., 1991. Les importations de fruits tropicaux et d'agrumes en France. *Fruits*, **47**, 349-373.
- LOEILLET D., 1994. The european mango market : a promising tropical fruit. *Fruits*, **49**, 332-334.
- LOEILLET D., 1996. Bilan mangue : consommateur européen cherche mangue de qualité. *Fruitrop*. **23**, 8-17.
- LUTZ A., WINTERHALTER P., 1993. Abscisic alcohol glucoside in quince. *Phytochemistry*, **32**, 57-60.
- MAC INNES A.G., BALL D.H., COOPER F.P., BISHOP C.T., 1958. Separation of carbohydrate derivatives by gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **1**, 556-557.
- MAC LEOD A.J., GONZALEZ de TROCONIS N., 1982. Volatile flavour components of mango fruit. *Phytochemistry*, **21**, 2523-2526.
- MAC LEOD A.J., PIERIS N.M., 1984. Comparison of volatile components of some mango cultivars. *Phytochemistry*, **23**, 361-366.
- MAC LEOD A.J., SNYDER C.H., 1985. Volatile components of two cultivars of mango from Florida. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 380-384.
- MAC LEOD A.J., MAC LEOD G., SNYDER C.H., 1988. Volatile aroma constituents of mango (cv. Kensington). *Phytochemistry*, **27**, 2189-2193.
- MAC LEOD A.J., SNYDER C.H., 1988. Volatile components of mango preserved by deep freezing. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 137-139.
- MARCELIN O., 1992. Caractérisation des polysaccharides pariétaux de la goyave (*Psidium guajava* L.). Application à l'obtention de nouveaux types de purées par voie enzymatique. Thèse de Doctorat Université Montpellier II, France.
- MARLATT C., HO C.T., CHIEN M., 1992. Studies of aroma constituents bound as glycosides in tomato. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 249-252.
- MARTEAU G., 1967. Pectinolytic enzymes and grape and apple technology. *Ann. Nutrit. Alim.*, **21**, 223-245.
- MATHUR V.K., ANTHONYDAS S., JAYARAMAN K.S., BATHIA B.S., 1972. Preparation of fruit bars for use in combat ration. *Indian Food Packer*, **26**, 33-35.

- MAYERL F., NÄF R., THOMAS A.F., 1989. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside : Isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry*, **28**, 631-633.
- MURRAY K.E., SHIPTON J. WHITFIELD F.B., 1972. 1. Volatile constituents of passion fruit, *Passiflora edulis*. *Aust. J. Chem.*, **25**, 1921-1933.
- NANJUNDASWAMY A.M., RADHA KRISHNAIAH SHETTY G., SAROJA S., 1976. Studies on the development of newer products from mango. *Ind. Food Packer*, **30**, 59.
- NAVILLE R., 1993. Les importations françaises de fruits tropicaux et subtropicaux en 1982. *Fruits*, **38**, 431-440 .
- NURSTEN H.E., 1970. In : *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 2 , (Ed.) HULME A.C., Academic Press, New York, pp. 239-268.
- OHLOFF G., 1972. Classification and genesis of food flavors. *Flav. Indust.*, 501-508 .
- OLLÉ D., LOZANO Y.F., BRILLOUET J.M., 1996. Isolation and characterization of soluble polysaccharides and insoluble cell wall material of the pulp from four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2658-2662.
- OLLÉ D., 1997. Caractérisation des polysaccharides et des composés aromatiques de différents cultivars de mangue (*Mangifera indica* L.). Devenir de ces constituants lors de la préparation de concentrés aromatiques pulpeux. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA), Massy, France.
- OLLÉ D., BARON A., LOZANO Y.F., SZNAPER C., BAUMES R., BAYONOVE C., BRILLOUET J.M., 1997. Microfiltration and reverse osmosis affect recovery of mango puree flavor compounds. *J. Food Sci.*, (sous presse).
- PABST A., BARRON D., ETIEVANT P., SCHREIER P., 1991. Studies on the enzymatic hydrolysis of bound aroma constituents from raspberry fruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 173-175.
- PABST A., BARRON D., SEMON E., SCHREIER P., 1992a. 4-Oxo- $\beta$ -ionol and linalool glycosides from raspberry fruits. *Phytochemistry*, **31**, 4187-4190.
- PABST A., BARRON D., SEMON E., SCHREIER P., 1992b. Two diastereomeric 3-oxo- $\alpha$ -ionol  $\beta$ -D-glucosides from raspberry fruit. *Phytochemistry*, **31**, 1649-1652.
- PARLIMENT T.H., 1989. Thermal Generation of Aromas : An Overview In : Thermal Generation of Aromas. (Eds) Parliment T.H., Mc Gorrin R.J. and HO C.T. ACS Symposium, Series 409, Washington, DC, pp. 2-11.

- PALMER J.K., 1973. Separation of components of aroma concentrates on the basis of functional group and aroma quality. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 923-925.
- PATTABHIRAMAN T.R., SASTRY L.V.L., ABRAHAM K.D., 1969. Preliminary studies in the extraction of odoriferous principles from mango. *Parfum Essent. Oil Res.*, **60**, 233-238.
- PECOUT M.C., CROUZET J., AYMARD C., 1986. Optimisation de la macération et de la liquéfaction de la pulpe de mangue. Symposium Fédération Internationale des Producteurs de Jus de Fruits. Den Haag, Netherlands, pp. 503-514.
- PILNIK W., de VOS L., 1970. Apfelsaft-gewinnung mittels maische-fermentierung. *Flüss. Obst*, **37**, 430-432.
- PILNIK W., VORAGEN A.G.J., de VOS L., 1975. Enzymatische Verflüssigung von Obst und Gemüse. *Flüss. Obst*, **42**, 448-451.
- PILNIK W., 1983. Enzymes in beverage industry (fruit juices, nectar, wine, spirits and beer). In : Utilisation des enzymes en Technologie Alimentaire. (Ed.) Dupuy P. Tec. & Doc. Lavoisier Paris, pp. 425-436.
- PINO J., ROSADO A., SANCHEZ R., 1989. Volatile components of three cultivars of mango from Cuba. *Die Nahrung.*, **33**, 709-715.
- PURSEGLOVE J.W., 1974. *Anacardiaceae*. In : *Tropical crops dicotyledons*. (Ed.) PURSEGLOVE J.W., Longman, London, pp. 18-32.
- RAMDAS NAYAK V., DEV S., 1960. Sesquiterpenes : hydration of longifolene. *Tetrahedron*, **8**, 42-48.
- RAZUNGLES A., GÜNATA Z., PINATEL S., BAUMES R., BAYONOVE C., 1993. Etude quantitative de composés terpéniques norisoprenoïdes et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sci. Aliments*, **13**, 59-72.
- REKTORIK J., 1983. Thermal desorption of solid trap by means of microwave energy. In Rijks, J. (Ed.), proceedings of 5 th International Symposium on Capillary Chromatography. Amsterdam. *Elsevier Sci. Publ.*, pp. 396-405.
- RODRIGUEZ F., 1978. Etude des constituants volatils de l'abricot. Influence des traitements technologiques. Thèse de 3e cycle, Université de Montpellier II.
- ROE J.F., OESTERLING M.J., 1944. Determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in plant tissues by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *J. Biol. Chem.*, **152**, 511-517.

- ROMBOUTS F.M., PILNIK W., 1971. Pektolytische enzyme in der fruchtsaftindustrie. *Flüss. Obst*, **38**, 93-96.
- ROMBOUTS F.M., PILNIK W., 1978. Enzymes in fruits and vegetables juice technology. *Process Biochemistry*, **13**, 9-13.
- SAHNI C.K. et KHURDIYA D.S., 1989. Effect of ripening and storage on mango nectar. *Indian Food Packer*, **43**, 5-11.
- SAKATA I., MITSUI T., 1975. Constituents of japanese pepermint. VI. Isolation and identification of 1-menthyl- $\beta$ -D-glucoside from Shubi. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1329-1330.
- SAKHO M., CROUZET J., SECK S., 1985a. Volatile components of African mango. *J. Food Sci.*, **50**, 548-550.
- SAKHO M., CROUZET J., SECK S., 1985b. Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage. *Lebensm. Wiss. u. -Technol.*, **18**, 89-93.
- SAKHO M., CHASSAGNE D., JAUS A., CHIARAZZO E., CROUZET J., 1997b. Enzymatic maceration of mango pulp, effect on the volatile components. Soumis à *J. Food Sci.*
- SAKHO M., CHASSAGNE D., CROUZET J., 1997a. African mango glycosidically bound volomponds. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 883-888.
- SALLES C., ESSAIED P., CHALIER P., JALLAGEAS J.C., CROUZET J., 1988. Evidence and characterization of glycosidically bound volatile components in fruits. In : *Bioflavour'87* (Ed.) Schreier P., Walter Gruyter & Co, Berlin & New York, pp. 145-159.
- SALLES C., 1989. Etude structurale des hétérosides précurseurs d'arôme dans le raisin (Muscat d'Alexandrie) et l'abricot (Rouge du Roussillon). Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II, France.
- SALLES C., JALLAGEAS J.C., CROUZET J., 1990a. Chromatographic separation and partial identification of glycosidically bound volatile components of fruit. *J. Chromatogr.*, **522**, 255-265.
- SALLES C., JALLAGEAS J.C., FOURNIER F., TABET J.C., CROUZET J., 1990b. Analysis of fruit monoterpenyl glycosides by non destructive methods. In : *Flavour Science and Technology*, 6th Symposium (Eds.) Bessiere Y., Thomas A.F., pp 233-236.
- SALLES C., JALLAGEAS J.C., FOURNIER F., TABET J.C., CROUZET J., 1991. Apricot glycosidically bound volatile components. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1979-1983.

- SAULNIER L., 1987. Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin (Carignan rouge). Thèse de Doctorat Université Paul Sabatier, Toulouse.
- SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1977a. The quantitative composition of natural and technologically changed aromas of plants. IV. Enzymic and thermal reaction products formed during the processing of tomatoes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **165**, 23-27.
- SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., MICK W., 1977b. The quantitative composition of natural and technologically changed aromas of plants. II. Aromas compounds in oranges and their changes during juice processing. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **164**, 188-193.
- SCHREIER P., DRAWERT F., STEIGER G., MICK W., 1978. Effect of enzyme treatment of apple pulp with a commercial pectinase and cellulase on the volatiles of the juice. *J. Food Sci.*, **43**, 1797-1800.
- SCHREIER P., DRAWERT F., BHIWAPURKAR S., 1979. Volatile compounds formed by thermal degradation of  $\beta$ -carotene. *Chem. Mikrobiol. Technol., Lebensm.*, **6**, 90-91 .
- SCHREIER P., IDSTEIN H., 1984. Untersuchungen über die Aromastoffzusammensetzung enzymatisch Verflüssigter Guava (*Psidium guajava* L.) und Mango (*Mangifera indica* L. var. Alphonso). *Fruchtpulpen. Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **80**, 335-340.
- SCHREIER P., KITSTEIN-EBERLE R., IDSTEIN H., 1985. Untersuchungen zur enzymatischen verflüssigung tropischer fruchtpulpen Guava (*Psidium guajava* L.), Papaya (*Carica papaya* L.), Mango (*Mangifera indica* L. var. Alphonso). *Flüss. Obst*, **7**, 365-370.
- SCHULTZ T.H., FLATH R.A., MON T.R., EGGLYING S.B., TERANISHI R., 1977. Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 374-379.
- SCHWAB W., SCHREIER P., 1988. Simultaneous enzyme catalysis extraction : a versatile technique for the study of flavor precursors. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1238-1242.
- SCHWAB W., MAHR C., SCHREIER P., 1989. Studies on the enzymic hydrolysis of bound aroma components from *Carica papaya* fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1009-1012.
- SCHWAB W., SCHELLER G., SCHREIER P., 1990. Glycosidically bound aroma components from sour cherry. *Phytochemistry*, **29**, 607-612.
- SCHWAB W., SCHREIER P., 1990a. Glycosidic conjugates of aliphatic alcohols from apple fruit (*Malus sylvestris* Mill. cult. Jonathan). *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 757-763.
- SCHWAB W., SCHREIER P., 1990b. Vomifoliol 1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside : a disaccharide glycoside from apple fruit. *Phytochemistry*, **29**, 161-164.

- SECK S., CROUZET J., PIVA M.T., 1976. Influence des traitements thermiques sur la nature des constituants volatils de la tomate. *Ann. Technol. Agric.*, **25**, 85-95.
- SECK S., CROUZET J., 1981. Formation of volatile compounds in phenylalanine ascorbic acid-phenylalanine model systems during heat treatment. *J. Food Sci.*, **46**, 790-793.
- SEFTON M.A., SKOUROUMOUNIS G.K., MASSY-WESTROPP R.A., 1989. Norisoprenoïds in *Vitis vinifera* white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits. *Aust. J. Chem.*, **42**, 2071-2084.
- SEFTON M.A., WILLIAMS P.J., 1991. Generation of oxidation artifacts during the hydrolysis of norisoprenoïds glycosides by fungal enzyme preparation. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1994-1997.
- SHIBAMATO T., TANG C.S., 1990. « Minor » tropical fruits. Mango, papaya, passion fruits and guava. In : Food Flavours part C : The Flavour of Fruits (Eds.) Morton I.D., MacLeod A.I. Elsevier, pp. 221-280.
- SIESO V., NICOLAS M., SECK S., CROUZET J., 1976. Constituants volatils de la tomate. Mise en évidence et formation par voie thermique du trans hexène-2 ol. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2349-2353.
- SIESO V., CROUZET J., 1977. Tomato volatile components : effects of processing. *Food Chem.*, **2**, 241-252.
- SKOUROUMOUNIS G.K., WINTERHALTER P., 1994. Glycosidically bound norisoprenoïds from *Vitis vinifera* cv. Riesling leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1068-1072.
- SOUTHWELL I.A., ARMSTRONG J.A., 1982. Essential oil of the *Genius ziera* (Rutaceae). VIIIe Congrès International des Huiles Essentielles, Canne, Grasse. *Annales Techniques*, pp. 323-337.
- SOUTY M., REICH M., 1978. Effets de traitements technologiques (congélation et appertisation) sur certains constituants de l'arôme des pêches. *Ann. Technol. Agric.*, **27**, 837-848.
- SREEKANTIAH K.R., JALEEL S.A., RAMACHANDRA RAO T.N., 1971. Utilization of fungal enzymes in the liquefaction of soft fruits and extraction and clarification of fruit juices. *J. Food Sci. Technol.*, **8**, 201-203.
- SREENATH H.K., NANJUNDASWAMY A.M., SREEKANTIAH K.R., 1987. Effect of various cellulases and pectinases on viscosity reduction of mango pulp. *J. Food Sci.*, **52**, 230-231.

- SREENATH H.K., SUDARSHANA KRISHANA K.R., SANTHANAM K., 1995. Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **28**, 196-200.
- STAHL-BISKUP E., 1987. Monoterpene glycosides state of the art. *Flavour Fragrance J.*, **2**, 75-82.
- STENHAGEN E., ABRAHAMSON J., Mac LAFFERTY F.W., 1974. Registry of mass spectral data. John Wiley & Sons Inc., New York.
- STRAUSS C.R., GOOLEY P.R., WILSON B., WILLIAMS P.J., 1987. Application of droplet countercurrent chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenoids, phenols and other constituents of grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 519-524.
- STRAUSS C.R., WILSON B., WILLIAMS P.J., 1988. Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 569-573.
- SUAREZ M., DUQUE C., WINTOCH H. and SCHREIER P., 1991. Glycosidically bound aroma compounds from the pulp and the peelings of lulo fruits (*Solanum vestissimum* D.). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1643-1645.
- SUBRAMANYAN H., KRISHMAMURTHY S., PARPIA H.A.B., 1975. Physiology and biochemistry of mango fruit. In : *Adv. Food Res.*, vol. 21, Academic Press, New York-Londres, pp. 223-305.
- SULLIVAN J.E., SCHEWE L.R., 1977. Preparation and gas chromatography of highly volatile trifluoroacetylated carbohydrates using N-methyl bis (trifluoroacetamide). *J. Chromatographic Sci.*, **15**, 196-197.
- SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M., WELLS W.W., 1963. Liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497-2507.
- SWEET D.P., SHAPIRO R.H., ALBERSHEIM P., 1975. Quantitative analysis by various GLC response factor theories for partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.*, **40**, 217-225.
- TATUM J.H., NAGY S., BERRY E.R., 1975. Degradation products formed in canned single-strength orange juice during storage. *J. Food Sci.*, **40**, 707-709.
- TRESSL R., ENGEL K.H., KOSSA M., KÖPPLU H., 1983. Characterization of tricyclic sesquiterpenes in hop (*Humulus lupulus*, var. Hersbrucker spät). *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 892-897 .

- VAN DEN DOOL H., KRATZ P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **11**, 463-471.
- VAN SOEST P.J., WINE R.H., 1967. Use of detergent in the analysis of fibrous feed. IV Determination of plant cell wall constituents. *J. AOAC*, **50**, 50.
- VOIRIN S., 1990. Connaissance de l'arôme du raisin : analyse et synthèse de précurseurs hétérosidiques. Thèse de Doctorat Université Montpellier II, France.
- VOIRIN S.G., BAUMES R.L., GÜNATA Z.Y., BITTEUR S.M., BAYONOVE C.L., TAPIERO C., 1992a. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. I. XAD-2 extraction and gas chromatographic - mass spectrometric determination of synthetic glycosides. *J. Chromatogr.*, **590**, 313-328
- VOIRIN S.G., BAUMES R.L., SAPI S J.C., BAYONOVE C.L., 1992b. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr.*, **595**, 269-281.
- VORAGEN A.G.J., PILNIK W., 1981. Spezifische Enzymeinwirkung bei der Verflüssigung von Apfelzellwandpräparaten. *Flüss. Obst*, **48**, 261-264.
- VORAGEN A.G.J., TIMMERS J.P.T., LINSSEN J.P.H., SCHOLS H.A., PILNIK W., 1983. Methods for analysis for cell-wall polysaccharides of fruit and vegetables. *Z. Lebensm. Unter Forsch.*, **177**, 251-256.
- VORAGEN A.G.J., SCHOLS H.A., PILNIK W., 1986. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by HPLC. *Food Hydrocolloids*, **1**, 65-70.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B., 1980a. Hydroxylated linalol derivatives as precursors of volatile monoterpene of Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 766-771.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B., 1980b. New linalol derivatives in Muscat of Alexandria grapes and wines. *Phytochemistry*, **19**, 1137-1139.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R.A., 1982a. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21**, 2013-2020.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R.A., 1982b. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene  $\beta$ -glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1219-1223.

- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B., 1982c. Use of C<sub>18</sub> reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatogr.*, **235**, 471-480.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R.A., 1983. Glycosides of 2-phenylethanol and benzylalcohol in *Vitis vinifera* grapes. *Phytochemistry*, **22**, 2039-2041.
- WILLIAMS P.J., SEFTON M.A., FRANCIS I.L., 1992. Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor. In : *Flavor Precursors, Thermal and Enzymatic Conversions*. (Eds.) TERANISHI R., TAKEOKA G.R., GÜNTER M., ACS Symposium, Series 490, Washington, DC, pp. 74-89.
- WILSON B., STRAUSS C.R., WILLIAMS P.J., 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 919-924.
- WILSON B., STRAUSS C.R., WILLIAMS P.J., 1986. The distribution of free and glycosidically bound monoterpenes among skin, juice and pulp fraction of some white grapes varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 107-111.
- WILSON C.W.III, SHAW P.E., KNIGHT R.J. Jr., 1986. Importance of selected volatile compounds to mango (*Mangifera indica* L.). In : *Proceedings of the 10 th International Congress of Essential Oils, Fragrance and Flavors*, Washington D.C., USA (Eds.) LAWRENCE B.M., MOOKHERJEE, WILLIS B.J. Flavors and fragrance : a world perspective, pp. 283-284.
- WILSON C.W., SHAW P.E., KNIGHT R.J., 1990. Importance of some lactones and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3-(2H)-furanone to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1556-1559.
- WINTERHALTER P., SCHREIER P., 1988a. Free and bound C<sub>13</sub> norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1251-1256.
- WINTERHALTER P., 1990. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 452-455.
- WINTERHALTER P., HARMSSEN S., TRANI F., 1991. A C<sub>13</sub> norisoprenoid gentiobioside from quince fruit. *Phytochemistry*, **30**, 3021-3025.
- WINTERHALTER P., 1992. Oxygenated C<sub>13</sub> norisoprenoïd, important flavor precursors. In : *Flavor Precursors, Thermal and Enzymatic Conversions*. (Eds.) Teranishi R., Takeoka G.R. and Günter M., ACS Symposium, Series 490, Washington, DC, pp. 98-115.

- WINTERHALTER P., SCHREIER P., 1995. The generation of norisoprenoid volatiles in starfruit (*Averrhoa Carambola* L.) : A review. *Food Reviews International*, **11**, 237-254.
- WINTERHALTER P., 1997. Carotenoïd-derived aroma compounds : biogenetical and biotechnological aspects. In : *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*. Takeoka G., Teranishi R., Williams P.J., Kobayashi A. (Eds.) ACS Symposium Series 637 Am. Chem. Soc., Washington. D.C., pp. 295-308.
- WITEK S., KREPINSKY J., 1966. The composition of valerian oil (*Valeriana officinalis*). *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 1113-1123.
- WU P., KUO M.C., HARTMAN T.G., ROSEN R.T., HO C.T., 1991. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple (*Ananas comosus* L. Mer.). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 170-172.
- YAMAGUCHI K., NISHIMURA O., TODA H., MIHARA S., 1983. Chemical studies on tropical fruits. Ogawa and Co., Ltd., Academic Press, New York, pp. 93-117.

*LISTES DES  
FIGURES  
ET DES  
TABLEAUX*

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Mangue : fruit sur pousse (A), fruit en coupe (B), noyau (C) (Purseglove, 1974)
- Figure 2** Nature des glycosides identifiés comme précurseurs d'arôme dans divers fruits
- Figure 3** Mécanisme d'hydrolyse des principaux glycosides du fruit de la passion, établi selon celui démontré par Günata et al. (1988) pour l'hydrolyse des glycosides de terpénols
- Figure 4** CCM des quatre sous fractions liées isolées après fractionnement sur gel de silice : f(1), f(2), f(3), f(4). Témoins : Benzylglucoside (BG), Benzylrutinoside (BR), Terpénylglucoside (TG), Géranylglucoside (GG), Géranylrutinoside (GR)
- Figure 5** CCM de la sous fraction liée (f(2) après hydrolyse enzymatique (f(2)Hy), après hydrolyse acide (f(2)Hyac). Témoins sans enzyme (f(2)T). Témoins sucre : arabinose (ara), glucose (glu), rhamnose (rha)
- Figure 6** Séquence chimique pour la préparation des acétates d'alditol (exemple du xylose)
- Figure 7** Réactions de méthylation des glycosides
- Figure 8** Métabolisme probable de la dégradation de la lutéine (adapté selon Williams et al , 1992 et Winterhalter, 1992)
- Figure 9** Etapes générales de la transformation des caroténoïdes en composés d'arôme (d'après Winterhalter, 1997)
- Figure 10** Fragments majeurs issus de la biodégradation de caroténoïdes par les dioxygénases (Winterhalter, 1997)
- Figure 11** Fragmentation des glucosides trifluoroacétylés en impact électronique (exemple des  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides TFA (Voirin, 1990)
- Figure 12** Structure du glucoside de vomifoliol

- Figure 13** Spectres de masse de diglycosides en impact électronique
- Figure 14** Spectres de masse ICN de dérivés trifluoroacétylés de linalyl Glp(A), 2-phényléthyl Glcp (B), linalyl Rhap-Glcp (C) et linalyl Araf-Glcp (D), (Chassagne, 1996)
- Figure 15** Oses constitutifs des polyosides D-Glcp : D-glucopyranose D-Glcp : Acide D-glucopyranosyluronique ; L-Araf : L-arabinofuranose
- Figure 16** Structure globale des pectines (Marcelin, 1992)
- Figure 17** Mode d'action des enzymes pectolytiques
- Figure 18** Réacteur et montage utilisés pour l'étude de la macération de la pulpe de mangue
- Figure 19** Chromatogrammes des composés volatils de la mangue avant et après traitement enzymatique (macération) par la pectolyase d'*Aspergillus japonicus*
- Figure 20** Spectre de masse d'un composé non identifié
- Figure 21** Extraction des hétérosides sur colonne Amberlite XAD-2
- Figure 22** Hydrolyse enzymatique de l'extrait hétérosidique de mangue
- Figure 23** Hydrolyse acide de l'extrait hétérosidique de mangue
- Figure 24** Schéma d'un spectromètre de masse à filtre quadripolaire
- Figure 25** Synthèse du glucoside de furanéol

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Production mondiale de mangues
- Tableau 2** Principaux producteurs-exportateurs (fruits frais)
- Tableau 3** Composés volatils libres et liés dans divers fruits (en mg de linalol/kg de pulpe)
- Tableau 4** Composition en oses neutres de l'extrait glycosidique de la pulpe de mangue
- Tableau 5** Spectres de masse des acétates d'alditol partiellement méthylés des glycosides de la mangue
- Tableau 6** Dérivés méthylés des glycosides de mangue
- Tableau 7** Structures possibles de la partie osidique des glycosides de mangue
- Tableau 8** Principaux ions caractéristiques de la partie osidique des glycosides de référence trifluoroacétylés obtenus en ionisation par impact électronique et en ionisation chimique mode négatif
- Tableau 9** Spectres de masse des isomères du glucoside de vomifoliol trifluoroacétylé
- Tableau 11** Identification et tentative d'identification des glycosides de la fraction totale et sous fraction liée de la mangue en impact électronique
- Tableau 12** Interprétation des ions fragments caractéristiques des parties osidiques des dérivés trifluoroacétylés des glycosides témoins en ionisation chimique en mode négatif (Chassagne et al, 1995)
- Tableau 13** Glycosides de mangue détectés après ICN
- Tableau 14** Degré de méthylation de quelques substances pectiques (Voragen et al, 1986)

**Tableau 15** Enzymes agissant sur les substances pectiques acides et neutres d'après Baron (1990), Brillouet et al (1990), Marcelin (1992)

**Tableau 16** Concentration de composés aromatiques avant et après traitement enzymatique (macération) par la pectolyase d'*Aspergillus japonicus*

**Tableau 17** Composés identifiés après traitement enzymatique de la pulpe de mangue par la pectolyase

## Résumé

Les composés d'arôme libres de la mangue (*Mangifera indica L.*), extraits par différentes techniques, ont été analysés en couplage CPG-SM. Des composés nouveaux, en majorité des terpènes et des sesquiterpènes, ont été identifiés, ainsi que des composés liés au métabolisme des acides gras. La mise en évidence de la diversité biologique de ces fruits au plan aromatique a été réalisée.

La fraction liée, de nature glycosidique, a permis de caractériser les aglycones et les oses constitutifs de ces hétérosides, après hydrolyse acide et enzymatique. Le glucose représente 80% des sucres. Les hétérosides précurseurs d'arôme de la pulpe de mangue, seraient constitués de 70% de monoglucosides et de 30% de diglycosides sous forme d'arabinoglucosides, de rutinosides, de gentiobiosides et d'apioglucosides. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse impact électronique et ionisation chimique en mode négatif, ont permis de confirmer la présence de monoglucosides, de rutinosides et d'arabinoglucosides dans l'extrait de mangue, après comparaison avec des hétérosides de référence. Les données spectrales obtenues, laissent également supposer la présence de gentiobiosides et d'apioglucosides.

Le traitement thermique de la pulpe de mangue a conduit à une baisse relative de la concentration de certains composés terpéniques, ainsi qu'à la formation de composés, résultant de la dégradation de  $\beta$ -carotène et d'acide ascorbique et également à l'augmentation de la teneur en  $\alpha$ -terpinéol qui pourraient provenir de l'hydrolyse des précurseurs. La macération de la pulpe de mangue a permis une séparation des cellules entraînant ainsi une baisse de viscosité. La quantité d'enzymes utilisée, jouerait un rôle important dans la stabilité du trouble du jus. L'analyse du profil aromatique de la pulpe traitée par la pectolyase, montre une augmentation relative de la concentration des monoterpènes, une baisse de celle des sesquiterpènes et esters d'acide gras.

**Mots clés:** Mangue (*Mangifera indica L.*), arôme, composés volatils, glycosides, précurseurs d'arôme, traitement thermique, traitement enzymatique.

---

## Summary

Free aroma compounds were extracted by different methods and were analyzed by coupled GC-MS. Several terpenes, sesquiterpenes and lipid metabolism components were identified for the first time. The aromatic biological diversity of these fruits was described.

Bound glycosidically fraction was studied. The aglycons and sugars released by enzymatic and acid hydrolysis of these heterosidic compounds were identified and the glucose 80%, was the most important carbohydrate. Monoglucosides (70%) and diglycosides (30%) are constitutive of the saccharidic moiety of mango glycosidically bound components. The presence of monoglucosides, arabinoglucosides and rutinosides were confirmed by comparison of chromatographic and spectral results, particularly by Negative Chemical Ionisation and Electronic Impact mass spectrometry, with those of trifluoroacetylated reference components. Gentiobiosides and apioglucosides were tentatively identified from their spectral data.

The heated pulp was characterized by the decrease of relative concentration of some terpenic compounds, the formation of constituents resulting of the degradation of  $\beta$ -carotene and ascorbic acid. The increase of relative per cent of  $\alpha$ -terpineol, should be result of the precursor hydrolysis. The separation of cells was obtained by the mango pulp maceration, enzymatic treatment. It was led to the decrease of the viscosity. The quantity of enzymes used, should be important for the stability of trouble juice.

The increase of relative monoterpene concentration, the decrease of that of sesquiterpene and fatty acid ester compounds, were occurred after mango pulp treatment by pectolyase.

**Key words :** Mango (*Mangifera indica L.*), aroma, volatile components, glycosides, aroma precursors, heat treatment, enzymatic treatment.