

## LE FORMOL DANS LES PRODUITS MARINS

### INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR L'ANHYDRIDE SULFUREUX

par France SOUDAN, Gilbert BRUN, Claude SCHREIBER et Lucette RENAULD

L'un de nous <sup>(1)</sup> a déjà exposé, après d'autres auteurs, comment le formol se produisait naturellement dans les produits marins : poissons frais, poisson salé, crustacés en conserves, en raison de la dissociation de l'oxyde de triméthylamine qui est l'un de leurs constituants normaux. La réaction chimique se poursuit pendant la conservation de telle sorte que la teneur en formol peut devenir fort élevée dans les produits comme les poissons salés qui sont gardés habituellement plusieurs mois.

Ce formol peut se fixer sur les constituants du poisson dont la formule chimique comprend un radical — NH<sub>2</sub> basique, c'est-à-dire la masse des constituants azotés et notamment l'ammoniaque. Avec l'ammoniaque, il forme de l'hexaméthylène tétramine qui ne se distingue en rien de celui qui serait additionné éventuellement dans un but de conservation. La seule distinction qui puisse être envisagée est celle des doses. Existe-t-il une dose au-delà de laquelle le formol peut être considéré comme d'origine étrangère ?

#### *Teneurs ordinaires en formol de divers produits marins.*

Nous avons cherché à déterminer quelles étaient les teneurs usuelles en formol dans divers produits salés : anchois, harengs saurs, morue et dans des conserves de crevettes (tabl. I). La méthode

Produits	Nombre examiné	FORMOL EN MG POUR 100 G			
		min.	max.	moy.	écart type
Anchois salés (la plupart préparés à l'huile) .....	21	0,5	5,1	3,04	1,24
Filets de harengs saurs .....	12	1,0	8,25	3,76	2,33
Filets de harengs saurs (supposés exempts d'eau) .....		3,0	20,0	9,12	5,16
Morue salée (retailles) <sup>(1)</sup> .....	69	2,3	47,0	25,7	12,24
Morue salée (supposée exempte d'eau) .....		4,8	98,9	53,6	27,07
Crevettes en conserves (supposées exemptes d'eau) ....	14	34,6	77,3	54,2	14,54

(1) Les retailles sont des fragments de muscle enlevés à la mise en filets, comprenant essentiellement des bords de paroi abdominale et des bandes provenant du dos, sous les nageoires dorsales. Leur valeur marchande est très réduite. Aussi sont-elles simplement séchées avant d'être expédiées vers les régions tropicales.

TABL. I. — *Teneur en formol de produits préparés à base de poissons ou de crustacés.*

employée a été celle déjà décrite dans le premier mémoire (SOUDAN, 1959). Elle consiste à isoler le formol par distillation en milieu acide après réduction de l'oxyde de triméthylamine par le chlorure de titane. Le formol est dosé dans le distillat par colorimétrie du composé produit par réaction sur l'acide chromotrope en milieu sulfurique.

(1) SOUDAN (F.), 1959. — Le microdosage du formol dans les produits marins. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **23** : 203-10.

Il semblerait que les teneurs les plus élevées doivent se rencontrer dans les harengs saurs qui peuvent absorber une certaine quantité de formol pendant le fumage. En fait, elles se trouvent dans les crevettes en conserves et dans la morue salée où elles avoisinent parfois 1 g par kg de matière sèche. Les valeurs trouvées sont très dispersées dans un intervalle relativement large. D'après les renseignements que nous possédons, les produits examinés, issus de la fabrication courante, n'avaient reçu, comme il est d'usage, aucune addition de formol ou de l'un de ses dérivés.

L'analyse statistique des résultats dans le cas de la morue salée prouve effectivement que le formol vient en totalité de l'oxyde de triméthylamine.

L'étude a porté sur 69 échantillons de retailles, formés chacun de 2 ou 3 fragments groupés par teinte, la teinte étant souvent significative de l'ancienneté du salage. Ces échantillons provenaient de 13 ateliers de salage situés à Fécamp ou à Saint-Malo.

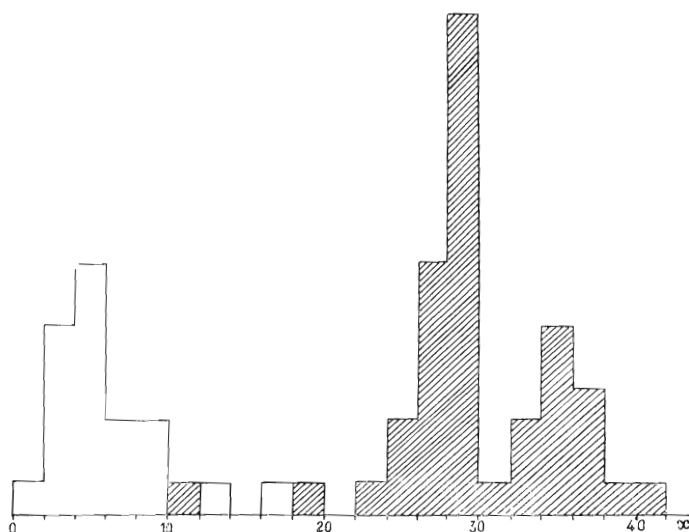


FIG. 1. — Distribution du taux de transformation  $x$  de l'oxyde de triméthylamine en formol pour les 69 échantillons de morue salée (hachurés les 46 échantillons provenant des ateliers à taux élevé).

Considérons le rapport  $x$  du formol à l'oxyde de triméthylamine initial ; si le formol provient en totalité de l'oxyde de triméthylamine, ce rapport  $x$  représente le taux de transformation dans l'échantillon. Ce taux dépend à priori du traitement subi et de l'âge de l'échantillon. Pour un ensemble d'échantillons ayant subi le même traitement, et à condition que leurs âges ne soient pas trop variables, on doit s'attendre à trouver une distribution normale du rapport  $x$ .

La quantité initiale d'oxyde de triméthylamine de l'échantillon est calculée en additionnant les teneurs actuelles en oxyde de triméthylamine, triméthylamine et formol, exprimées en millimolécules grammes pour 100 g de matière sèche. On sait en effet que l'oxyde se dégrade pendant la conservation soit en triméthylamine par voie bactérienne, soit en formol et diméthylamine par voie chimique.

La distribution de  $x$  pour l'ensemble des 69 échantillons est représentée par la figure 1 ; cette distribution, à plusieurs modes, n'est certainement pas normale. On peut donc conclure que les divers échantillons n'ont pas subi le même traitement.

A la simple inspection des données, il apparaît que les valeurs de  $x$  des échantillons provenant d'un même atelier sont voisines. Un test d'analyse de variance confirme le groupement par usine des taux de transformation  $x$  : la statistique  $F$  qui compare la variance des moyennes entre ateliers à la variance moyenne à l'intérieur des groupes par atelier, est  $F = 68,17$  ce qui est très hautement significatif (pour les nombres de degrés de liberté respectivement 12 et 56 la borne de probabilité 0,1 % est 3,3).

Ces ateliers se groupent assez naturellement en ateliers à taux élevé et ateliers à faible taux de transformation. Ce groupement est représenté sur la figure 1, on voit que les deux distributions de  $x$  se recoupent à peine. Le test d'homogénéité à l'intérieur de ces deux groupes donne le résultat suivant : ateliers à taux élevé (8 ateliers, 46 échantillons)  $F = 8,27$  — borne 0,1 % : 4,73 ; ateliers à faible taux (5 ateliers, 23 échantillons)  $F = 2,60$  — borne 5 % : 2,93.

Il semble, d'après ce résultat, que le groupe des ateliers à faible taux est plus homogène que le groupe hétérogène des ateliers à taux élevé ; cependant, la valeur non significative de  $F$  du groupe faible est due à un seul résultat relativement exceptionnel ( $x = 16,44$ ) qui augmente la variance intérieure. Cette indication suggère que le groupe à faible taux pratique le mode opératoire le plus simple, celui dont le résultat est le moins susceptible de varier suivant les habitudes particulières de chaque atelier et le groupe à taux élevé pratique un mode opératoire comportant au moins une opération supplémentaire variable.

N° d'usine	Nombre d'échantillons	Moyennes du taux $x$	Oxyde de Triméthylamine résiduel	Triméthylamine	Formol	Oxyde de Triméthylamine total
1	6	29,44	0,95	3,52	1,83	6,30
2	5	4,70	9,54	2,39	0,60	12,53
3	5	28,84	1,04	4,24	2,13	7,41
4	5	37,15	1,18	2,23	2,01	5,42
5	6	7,00	9,13	1,88	0,80	11,81
6	3	2,90	10,48	2,36	0,38	13,22
7	4	9,61	3,90	3,72	0,80	8,42
8	4	28,35	0,51	4,00	1,78	6,29
9	6	24,51	1,61	6,33	2,47	10,41
10	5	5,65	6,90	3,36	0,57	10,83
11	6	27,12	1,78	4,37	2,29	8,44
12	6	36,37	0,69	4,43	2,92	8,04
13	8	29,16	1,90	5,02	2,84	9,76
Moyenne usines taux faible	23	6,124	8,00	2,70	0,65	11,35
Moyenne usines taux élevé	46	30,028	1,27	4,36	2,34	7,97

TABLE II. — Moyenne du taux  $x$  et des teneurs en oxyde de triméthylamine, triméthylamine et formol (en millimolécules pour 100 g de matière sèche) des produits de 13 ateliers de salage et moyennes des usines à taux faible et des usines à taux élevé.

Cette opération supplémentaire comprend-elle une addition de formol ou de l'un de ses dérivés ? Une addition de formol se traduirait effectivement par une augmentation du rapport  $x$ , mais elle se traduirait aussi par une augmentation de la valeur estimée de la teneur initiale en oxyde de triméthylamine, puisque celle-ci est calculée à partir de la teneur actuelle en formol. Or, nous observons la situation opposée : la moyenne des estimations de la teneur initiale en oxyde pour les 46 échantillons du groupe « élevé » est 7,97 alors qu'elle est 11,35 pour les 23 échantillons du groupe « faible » (tabl. II). Ce résultat exclut complètement l'hypothèse d'une addition de formol.

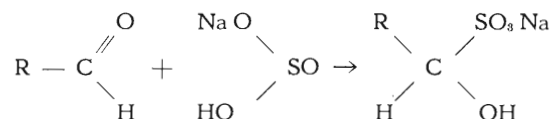
Examinons le tableau des moyennes par atelier, et, en particulier, les moyennes générales du groupe des ateliers « faibles ». Si les teneurs en triméthylamine sont peu différentes, la teneur en formol des produits des premiers est presque quatre fois plus élevée que celle des seconds ; au contraire, leur teneur en oxyde résiduel est plus de six fois moindre, amenant la teneur initiale calculée à un niveau inférieur et augmentant ainsi le rapport  $x$ . Le traitement supplémentaire a donc pour résultat : 1° de favoriser la transformation de l'oxyde de triméthylamine en formol ; 2° d'éliminer une grande partie de l'oxyde.

C'est le résultat que l'on peut attendre d'un lavage par une solution de bisulfite de sodium, tel qu'il est effectué couramment pour atténuer la teinte jaune qui se développe dans la morue pendant le stockage. Le bisulfite est ajouté au bain de trempage lorsque la morue est dessalée avant d'être livrée à la consommation. Lorsque les morues sont restées assez blanches pendant le stockage ou lorsque la date de vente paraît incertaine, les morues sont simplement lavées à la brosse sous une rampe de jets d'eau pour enlever le sel et les débris déposés à la surface du poisson sans risquer l'altération due à un dessalage excessif, d'où l'existence des deux groupes d'échantillons observés.

Un traitement au sulfite est appliqué également à certaines crevettes qui contiennent, comme nous l'avons vu, beaucoup de formol. Le sulfite est destiné à empêcher le noircissement de la chair par les mélanines qui se forment par oxydation de la tyrosine sous l'action de la tyrosinase du sang. La tyrosine fait partie des constituants non protéiques normaux des muscles de crustacés ; sa teneur augmente après la mort par suite de l'hydrolyse des protéines.

Dans les pays comme le Maroc, d'où provenaient les conserves de crevettes que nous avons analysées <sup>(1)</sup>, les crevettes sont saupoudrées aussitôt après la pêche avec 2 % de sulfite neutre de sodium, puis recouvertes d'un papier sulfurisé qui les protège du lessivage par la glace fondante. Le bisulfite est éliminé partiellement pendant la cuisson.

L'interférence du sulfitage sur la présence de formol dans la morue ou dans les crevettes est à envisager en raison des possibilités de réaction des sulfites alcalins avec les aldéhydes :



La réaction pratiquement instantanée donne un composé stable en milieu neutre, mais facilement décomposé en milieu acide ou alcalin. La présence de sulfite à une concentration relativement élevée active la dissociation de l'oxyde de triméthylamine en fixant le formol au fur et à mesure de sa production, plus rapidement que ne sauraient le faire les radicaux — NH<sub>2</sub> alentour. Le dérivé bisulfitique se décompose par la suite en régénérant le formol.

Le dosage de l'anhydride sulfureux et du formol dans une série d'échantillons de morue et de conserves de crevettes montre effectivement qu'une forte addition d'anhydride sulfureux entraîne une forte production de formol.

### **Méthode de dosage de l'anhydride sulfureux.**

L'anhydride sulfureux a été isolé par entraînement par l'air en milieu acide. Il ne pouvait être dosé ici par oxydo-réduction en raison de la présence du formol qui aurait réagi simultanément. Il a été oxydé en SO<sub>4</sub><sup>--</sup> par l'eau oxygénée et dosé volumétriquement sous forme de sulfate de baryte selon la méthode de LE PEINTRE et RICHARD <sup>(2)</sup>.

Celle-ci est basé sur les propriétés adsorbantes du sulfate de baryum. Un précipité de sulfate de baryum en présence d'ions SO<sub>4</sub><sup>--</sup> les adsorbe et s'acidifie. Si les ions SO<sub>4</sub><sup>--</sup> sont neutralisés par addition d'un sel soluble de baryum, le précipité adsorbera les ions Ba<sup>++</sup> du sel en excès et deviendra alcalin. Le virage peut être mis en évidence en milieu hydroalcoolique par un indicateur d'adsorption tel que le sulfonate alizarine de sodium qui vire du jaune au rose à pH 3,7.

### **Technique.**

20 g de matière à examiner, découpée en petits fragments, sont placés avec 20 ml d'eau, dans un matras pourvu d'une entrée d'air et d'une ampoule à brome. Le matras est relié à un réfrigérant

(1) Nous tenons à remercier ici M. MEESEMAECKER, Directeur du Laboratoire de la Fédération des industries de la conserve du Maroc, des échantillons de conserves de crevettes qu'il nous a adressés et des renseignements qu'il a bien voulu nous fournir à leur sujet.

(2) LE PEINTRE (M.) et RICHARD (J.), 1956. — Détermination précise des sulfates dans les eaux par volumétrie directe. XXIX<sup>e</sup> Congrès de Chimie industrielle, Paris.

muni d'une pointe effilée qui vient plonger dans 20 ml d'ammoniaque 6 N contenu dans une fiole à vide. 2 ml d'acide phosphorique concentré sont introduits dans le matras, puis l'air est aspiré au moyen d'une trompe à vide pendant 10 minutes environ, de manière à former un bouillonnement continu. La solution transférée quantitativement dans un bécher de 250 ml est oxydée par 1 ml d'eau oxygénée (200 vol.) puis évaporée jusqu'à un volume de 20 ml environ pour éliminer NH<sub>3</sub>.

Le bécher reçoit alors les additions suivantes :

50 ml d'eau, 40 ml d'alcool à 96°,

1 ml d'une solution d'acide monochloracétique moléculaire partiellement neutralisé pour avoir pH 2,2

1 ml d'une suspension de sulfate de baryum dans l'eau soigneusement lavée jusqu'à neutralité,

0,1 ml d'une solution de sulfonate alizarine de sodium à 0,2 % dans l'eau.

On a préparé, d'autre part, une solution 0,005 M de perchlorate de baryum comme suit. L'acide perchlorique du commerce (d = 1,616) est dilué pour obtenir une solution 0,2 N (19,2 ml pour un litre). 4,934 g de carbonate de baryum pur (soit 25 millimolécules) sont mis en suspension dans 50 ml d'eau dans un bécher de 600 ml et reçoivent peu à peu 250 ml de la solution perchlorique 0,2 N. Le pH est ajusté au pH-mètre à 2,6 par addition d'acide perchlorique (environ 10 ml) puis la solution est transvidée quantitativement et ajustée dans une fiole jaugée de 500 ml. La solution 0,05 M ainsi obtenue est diluée au 1/10 au moment de l'emploi.

Son titre peut être contrôlé par rapport à une solution d'acide sulfurique de titre déterminé exactement (par pesée de sulfate d'ammonium par exemple). Nous avons vérifié ainsi que 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1053 N correspondaient à 5 ml Ba (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,1 M (2 titrages identiques).

Le dosage étant basé sur une adsorption, l'addition de la solution barytique doit être assez lente surtout en approchant du virage. Celui-ci est net néanmoins et peut être pris à la goutte en observant les parcelles de précipité qui flottent à la surface.

### Relation entre la teneur en anhydride sulfureux et celles de formol.

La méthode appliquée à de la morue salée et à des conserves de crevettes a révélé des teneurs en anhydride sulfureux comprises entre 1,4 et 16,8 mg pour 100 g de morue (18 échantillons) et 2,2 et 8,85 mg pour 100 g de crevettes égouttées (14 échantillons).

Les dosages dans les conserves ont été faits soit sur la chair, soit sur la couverture, soit sur la conserve homogénéisée ; les résultats ont été calculés par boîte et rapportés au poids de chair égouttée. Les teneurs en SO<sub>2</sub> de la chair et de la couverture paraissent sans relation avec leurs humidités respectives, ce qui indique que l'anhydride sulfureux est fixé au moins partiellement dans une combinaison insoluble dans l'eau.

La confrontation des teneurs en SO<sub>2</sub> et des teneurs correspondantes en formol fait apparaître la corrélation présumée (fig. 2). Dans le cas présent, la chair ou la couverture de la conserve d'une même boîte ont été considérées comme autant d'échantillons séparés, ce qui porte à 20 le nombre *n* des couples de mesures sur lequel peut porter le calcul statistique.

Les coefficients de corrélation « *r* » calculés sont 0,926 sur les morues, 0,700 pour les crevettes.

Date de fabrication	1958		1959				1960								
			Moy.		Moy.										Moy.
<i>Formol</i>															
Par boîte .....	14,4	15,8	15,1	13,4	14,1	13,8	9,5	10,0	15,1	14,8	8,7	8,8	7,7	8,3	10,3
% poisson égoutté ..	16,7	19,1	17,9	17,5	21,0	19,2	12,7	13,7	19,7	19,0	9,5	10,15	10,45	10,9	13,3
<i>Anhydride sulfureux</i>															
Par boîte .....	4,9	2,8	3,9	3,1	2,4	2,7	1,7	1,6	4,6	6,9	2,7	2,75	4,6	2,5	3,8
% poisson égoutté ..	5,7	3,4	4,5	4,1	3,6	3,8	2,3	2,2	6,0	8,85	3,9	3,2	6,2	3,3	4,5

TABL. III. — Teneurs en formol et anhydride sulfureux (exprimées en mg) dans des conserves de crevettes en boîtes 1/4 dingley (105 × 76 × 21,5).

La corrélation est donc très étroite dans le cas de la morue : la relation entre anhydride sulfureux et formol est proche de ce qu'on trouverait en cas de réaction stoechiométrique. Dans le cas des crevettes, la corrélation est moins bonne en raison des modifications apportées par la mise en conserve : échanges plus ou moins actifs entre la chair et la couverture selon leur composition et leur volume respectifs, les conditions de stérilisation, de vieillissement, etc. Dans les 12 échantillons dont nous connaissons l'époque de fabrication, la teneur en  $\text{SO}_2$  ne semble pas évoluer au cours de l'entreposage, alors que le formol continue à se produire lentement (tabl. III).

La corrélation reste néanmoins significative. Le calcul de l'expression  $t = r\sqrt{n-2}/\sqrt{1-r^2}$  distribuée comme le calcul de l'expression  $t$  de STUDENT montre que les chances de trouver un coefficient  $r$  de 0.700 entre  $n = 20$  couples de mesures prises au hasard sont inférieures à 1 pour 1 000.

Remarquons, d'ailleurs, que la droite de régression en  $x$  a la même pente dans les deux groupes d'échantillons. Ceci laisse supposer que la décomposition de l'oxyde de triméthylamine activée par l'anhydride sulfureux tend vers un état d'équilibre dans le tissu musculaire.

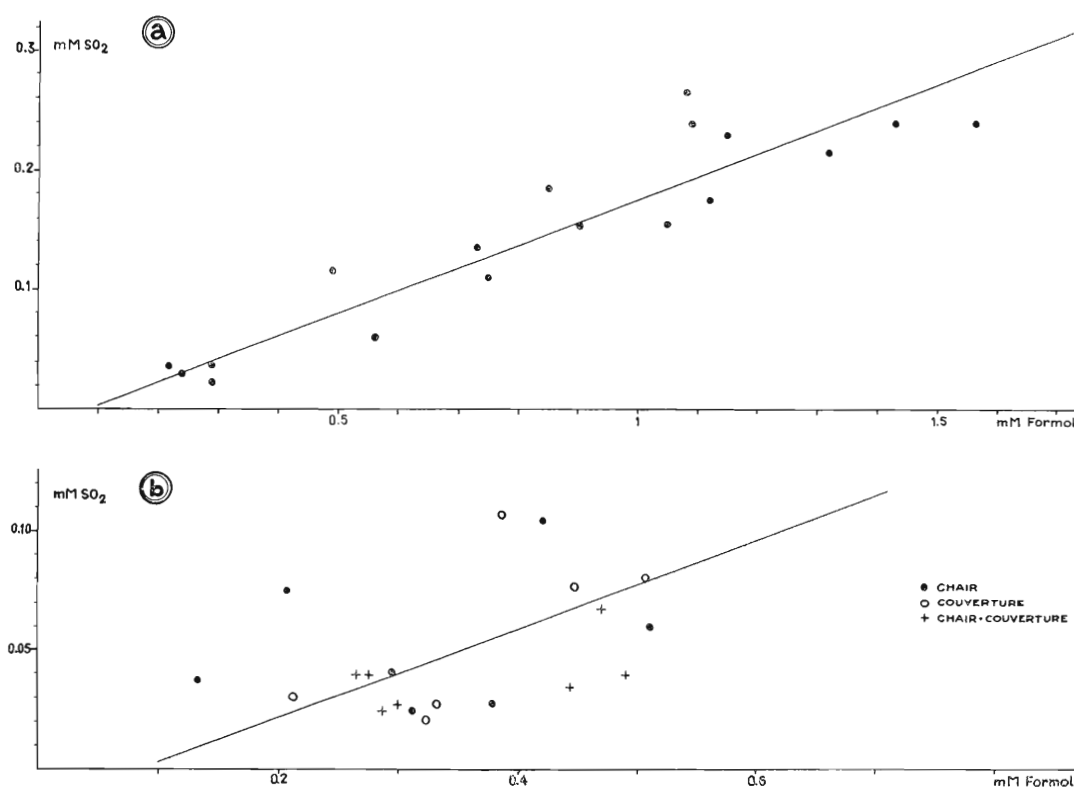


FIG. 2. — Teneurs en millimolécules de formol (x) et d'anhydride sulfureux (y) avec droite de régression en x, a dans la morue salée, b dans les crevettes en conserve.

*En conclusion*, le formol ou plus exactement, les produits de sa condensation avec les composés portant des radicaux aminés doivent être considérés comme des constituants normaux du poisson conservé, quelle que soit la méthode de conservation. Les quantités de formol susceptibles de se produire sont difficilement prévisibles. Elles peuvent avoisiner le gramme par kg de matière sèche lorsque la durée de conservation est assez longue. Elles deviennent particulièrement élevées quand les produits ont été traités au sulfite, ce qui peut arriver par exemple pour la morue salée et pour certaines crevettes.