

# POSSIBILITE DE DETECTION DE LA PRESENCE DE BLES TENDRES DANS LES PATES ALIMENTAIRES AYANT SUBI DES TRAITEMENTS THERMIQUES A HAUTE TEMPERATURE (1)

K. KOBREHEL\*, D. AGAGA\*, J.C. AUTRAN\*

## INTRODUCTION

La législation française interdit l'incorporation de blés tendres (*Triticum aestivum*) dans les pâtes alimentaires ; celles-ci doivent être fabriquées exclusivement à partir de blés durs (*Triticum durum*). La méthode officielle de détermination de la teneur en blé tendre dans les pâtes alimentaires et semoules (Journal Officiel du 15 janvier 1975) est basée sur la différence de composition électrophorétique en gel de polyacrylamide des peroxydases des deux espèces de blé (KOBREHEL et GAUTIER, 1974 ; KOBREHEL et FEILLET, 1975). C'est l'intensité d'une bande peroxydasique spécifique des blés tendres, celle de la **peroxydase a 7D**, qui est évaluée pour en déduire la teneur en blé tendre de l'échantillon analysé (FEILLET et KOBREHEL, 1974 ; KOBREHEL et FEILLET, 1976). En général les peroxydases ont une thermorésistance élevée. Ainsi, dans des conditions traditionnelles de fabrication des pâtes alimentaires la **peroxydase a 7D** ne subit aucune modification, son intensité ne décroît que lorsque les pâtes ont été soumises à des traitements thermiques prolongés à des températures dépassant les 75-80° C (KOBREHEL et FEILLET, 1976). Dans le cas de produits ayant subi de tels traitements (pâtes alimentaires appertisées, ou cuites, ou séchées à très haute température) l'application de la méthode officielle est limitée voire impossible ; elle tend à sous-estimer la teneur éventuelle en blé tendre de l'échantillon analysé. La méthode basée sur le dosage de palmitate de sitostérol (MATVEEF, 1952 ; GILLES et YOUNG, 1954 ; ARTAUD et al, 1979) bien que, restant applicable pour ces produits, doit être écartée pour son manque de spécificité (GUILBOT et al, 1959 ; GARCIA-FAURE et al, 1965 a et b ; CUSTOT et al, 1966). L'application de la méthode officielle italienne (Gazetta ufficiale delle Repubblica Italiana, n° 4, 7-11, 5 janvier 1980) n'était pas étudiée.

De récentes études menées dans notre laboratoire ont montré que le comportement électrophorétique de certaines protéines, notamment celui des  $\omega$ -gliadines ne se modifie pas, même après des traitements thermiques tel que la cuisson des pâtes (JEANJEAN et al, 1980 ; AUTRAN et al, 1981). Certaines de ces  $\omega$ -gliadines ne sont codées qu'au niveau du génome D, génome absent dans les blés durs et par conséquent ces protéines sont présentes dans les blés tendres mais absentes dans les blés durs. Une deuxième voie à signaler pourrait être celle de l'étude des protéines de haut poids moléculaire, protéines spécifiques de la glutéine, dont certaines sous-unités ne sont également codées que par le génome D.

Dans le présent article nous exposons les possibilités de détection et d'évaluation de la teneur en blé tendre dans les pâtes alimentaires ayant subi des traitements thermiques en se basant sur l'analyse des  $\omega$ -gliadines et de certaines protéines de haut poids moléculaire.

(1) Communication présentée le 12 décembre 1984

\* Laboratoire de Technologie des Céréales - INRA  
9, place Viala 34060 MONTPELLIER CEDEX

## 1 - MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Echantillons de pâtes analysés

Les échantillons de pâtes ont été préparés à partir de la semoule de la variété de blé dur Valdur contenant 0%, 3%, 8%, 13% ou 18% de farine de blé tendre. Les farines provenaient de trois variétés de blés tendres : Florence Aurore (très bonne qualité boulangère). Moisson (qualité boulangère moyenne) et Maris Huntsman (impanifiable). On a incorporé dans les pâtes soit la farine de l'une de ces variétés de blé tendre, soit le mélange des trois farines.

### 1.2. Traitements thermiques des pâtes

#### Séchage

Les échantillons de pâtes de type spaghetti fabriqués en utilisant une presse de laboratoire "Demaco" ont été séchés dans une étuve "Heraeus" réglée à 50° C, 75° C et 100° C pendant des durées variables, de manière à atteindre chaque fois une humidité finale de 15%.

#### Cuisson

Les cuissons des pâtes ont été effectuées dans l'eau distillée bouillante pendant 10 à 20 minutes.

### 1.3. Préparation des échantillons pour l'analyse.

Après séchage ces pâtes ont été broyées puis équilibrées à 13% d'humidité avant les analyses biochimiques. Les pâtes cuites ont été congelées et lyophilisées puis également broyées et équilibrées à 13% d'humidité.

### 1.4. Analyses électrophorétiques des protéines spécifiques

#### 1.4.1. Analyse des gliadines

Nous avons utilisé la technique décrite par BUSHUK et ZILLMAN (1978). La séparation électrophorétique des gliadines s'effectue dans un gel de polyacrylamide horizontal en milieu acide en utilisant un tampon lactate d'aluminium à pH 3,1.

- Composition du tampon : 5,5 ml d'acide lactique et 2,5 g de lactate d'aluminium dans 1000 ml d'eau distillée. On ajuste le pH à 3,1.

- Composition du gel : on dissout 10 g d'acrylamide, 0,75 g de NN'-méthylène-bis-acrylamide, 0,25 g d'acide ascorbique et 6,25 mg de sulfate ferreux dans 250 ml de tampon. La polymérisation s'effectue en y ajoutant 0,8 ml d'une solution de  $H_2O_2$  à 3%.

- Extraction des gliadines : 1 g de farine est mis en suspension dans 6 ml de chloro-2-éthanol à 25% contenant 25 p. 100 de saccharose et 0,02 p. 100 de pyronine. Après 1 heure de repos et 15 minutes de centrifugation à 3000 tours par minute, on prélève 12  $\mu$ l du surnageant pour chaque dépôt.

- Electrophorèse : la migration est réalisée durant 5 h 30 minutes sous un voltage constant de 14 V/cm.

- Coloration des gliadines : après la migration le gel est coupé dans le sens de l'épaisseur. Seule la partie inférieure est utilisée. Elle est placée dans 300 ml de solution d'acide trichloracétique à 12% dans laquelle on a ajouté 15 ml d'une solution alcoolique de bleu de Coomassie à 1 p. 100. La coloration des protéines est optimale après 24 heures mais les résultats sont lisibles après quelques heures.

#### 1.4.2. Analyse des protéines réduites.

La technique électrophorétique en gel de polyacrylamide vertical en milieu basique, tampon Tris-Glycine-SDS pH 8,6, décrite par PAYNE et CORNFIELD (1979) a été utilisée. Les protéines sont solubilisées en présence de sodium dodecanoate (KOBREHEL, 1980) puis réduites. La solubilisation peut également se faire directement par une solution réductrice.

- Composition du tampon : 14,11 g de glycine, 3 g de Tris et 1 g de SDS (dodécylsulfate de sodium) sont dissous dans 1000 ml d'eau désionisée.

- Composition du gel : le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : gel de concentration et gel de séparation. Pour la préparation des deux gels, on utilise du tampon Tris 1 M amené respectivement à pH 6,8 et à pH 8,8 à l'aide d'acide chlorhydrique concentré.

Pour le gel de séparation 12 g d'acrylamide et 54 mg de NN'-méthylène bis-acrylamide sont dissous dans 40 ml H<sub>2</sub>O, puis la solution est filtrée. A 35 ml on ajoute 23 ml de Tris 1M, pH 8,8, 0,6 ml de SDS à 10 p. 100, 30  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'- tétra méthyl éthylène diamine) et 2 ml de persulfate d'ammonium à 1 p. 100).

Pour le gel de concentration 700 mg d'acrylamide et 7,3 mg de N,N'-méthylène bis-acrylamide sont dissous dans 16,8 ml d'eau désionisée. On y ajoute 2,5 ml de Tris 1 M à pH 6,8, 0,2 ml SDS à 10 p. 100, 15  $\mu$ l de TEMED et 0,75 ml de persulfate d'ammonium à 1 p. 100.

- Extraction des protéines :

Solubilisation par les savons : 1 g de pâte cuite broyée et 80 mg de lauréate de sodium (Na dodecanoate) (1) sont mis en suspension dans 10 ml d'eau désionisée. Après deux heures d'agitation on centrifuge 10 minutes à 3000 tours par minute. On prélève 4 ml de surnageant auquel sont ajoutés 2 ml d'une solution réductrice, elle-même préparée en mélangeant 10 mg de pyronine, 6,4 ml de tampon Tris 1 M, pH 6,8, 2 g de SDS, 10 ml de glycérol, 12 ml d'eau désionisée et 5 ml de mercaptoéthanol. L'échantillon est porté à 90° C et y est maintenu pendant 3 minutes. Pour les dépôts sur le gel, 20  $\mu$ l de solution refroidie sont utilisés.

Solubilisation en milieu réducteur : les protéines peuvent être extraites directement par la solution réductrice décrite plus haut. Pour 1 g. de pâte broyée on utilise 5 ml de solution réductrice décrite plus haut et 10 ml d'eau désionisée. Les autres conditions d'extraction et de réduction des protéines sont les mêmes que précédemment.

- Electrophorèse : la migration est réalisée durant 16 heures à une intensité constante de 20mA.

- Coloration des protéines : le gel est placé dans une solution d'acide trichloracétique à 15 p. cent pour précipiter les protéines puis dans une solution colorante dont la composition pour 1000 ml est la suivante : 350 ml d'éthanol à 95°, 100 ml d'acide acétique, 1,5 g de bleu de Coomassie R 250 et 550 ml d'eau. Le gel doit rester dans cette solution à 80° C pendant 30 minutes puis encore 15 minutes à la température ambiante sous agitation lente. Pour enlever l'excès du colorant on place le gel pour une durée d'une heure dans une solution de même composition que celle utilisée pour la coloration mais qui ne contient pas de bleu de Coomassie. Le gel peut être ensuite conservé dans l'eau.

## 2 - RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Aspects qualitatifs

Les gliadines sont définies comme la fraction alcoolosoluble des protéines du blé. La technique de séparation par électrophorèse a permis la mise en évidence d'une grande hétérogénéité dans leur composition, leur classification en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\omega$  gliadines d'après leur mobilité électrophorétique proposée par JONES *et al* (1959) est utilisée depuis par la plupart des auteurs.

La figure 1 illustre la différence dans la composition des gliadines entre blés durs et blés tendres. Dans la zone des  $\omega$ -gliadines les bandes marquées 1, 2 et 3 sont toujours absentes chez les blés durs. BOYD et LEE (1967) puis BOYD *et al.* (1969) ont montré en effet que les  $\omega$ -gliadines les moins mobiles chez les blés tendres sont synthétisées par le chromosome 1D<sub>S</sub>, chromosome absent chez les blés durs. Lorsqu'on analyse des pâtes alimentaires, la présence de ces bandes signifie donc que l'échantillon étudié contient du blé tendre.

Notons que normalement toutes les variétés de blé tendre cultivées (la variété Darius serait une exception) contiennent ces  $\omega$ -gliadines synthétisées spécifiquement par le chromosome 1D<sub>S</sub> et inversement, aucune variété de blé dur ne peut les contenir. Il faut remarquer cependant que d'une variété de blé tendre à l'autre, ces  $\omega$ -gliadines spécifiques des blés tendres ne migrent pas au même niveau tout en utilisant des conditions électrophorétiques identiques, mais restent distinctes des  $\omega$ -gliadines des blés durs.

(1) On peut utiliser également soit du myristate, du palmitate ou du stéarate de sodium.

Les résultats présentés sur les figures 2 et 3 montrent que les  $\omega$ -gliadines spécifiques du blé tendre sont extractibles et qu'on peut les identifier en gel de polyacrylamide même après séchage des pâtes à 100° C ou après une cuisson de celles-ci pendant 10 minutes. Il est particulièrement intéressant de remarquer sur les électrophorogrammes que les bandes des  $\omega$ -gliadines ont tendance à se renforcer lorsqu'elles sont extraites des échantillons ayant subi une cuisson (comparer figures 1, 2 et 3) contrairement aux autres gliadines dont l'intensité diminue plutôt ou qui disparaissent entièrement dans ces mêmes conditions. Ainsi, la lecture des résultats est plutôt facilitée lorsque les pâtes alimentaires analysées sont cuites préalablement.

La composition des protéines des blés tendres de haut poids moléculaire, telle qu'on peut la détecter après réduction et séparation en gel de polyacrylamide en milieu basique et en présence de SDS diffère de celle des blés durs. Un certain nombre de ces protéines sont synthétisées par le chromosome 1DL (ORTH and BUSHUK, (1974), chromosome présent uniquement mais obligatoirement chez les blés tendres. Bien qu'il soit relativement facile de reconnaître les bandes spécifiques des blés tendres, le nombre de ces bandes peut, comme dans le cas des  $\omega$ -gliadines, varier d'une variété de blé tendre à l'autre et leur vitesse de migration peut être légèrement différente. La figure 4 illustre ces résultats.

Ces protéines de haut poids moléculaire semblent être également très thermorésistantes bien qu'ici une réduction soit nécessaire pour qu'elles migrent. Elles sont extractibles et détectables dans nos conditions électrophorétiques même lorsque les échantillons analysés ont été séchés à très haute température (100° C) ou qu'ils ont subi une cuisson de 10 minutes. Les résultats sont présentés sur la figure 5.

## 2.2. Aspects quantitatifs

L'évaluation quantitative de la teneur en blé tendre pourrait se faire probablement comme dans le cas de la méthode officielle (KOBREHEL et FEILLET, 1976) en comparant visuellement l'intensité des bandes spécifiques du blé tendre des échantillons inconnus à celles des pâtes témoins avec des teneurs connues. Il semble en effet, comme cela est illustré par les figures 2 à 5, qu'il existe une proportionnalité entre la teneur en blé tendre incorporée dans l'échantillon et l'intensité de la bande protéique spécifique du blé tendre. Néanmoins une étude plus approfondie est nécessaire pour pouvoir confirmer la possibilité du dosage quantitatif et de définir ses limites d'application ; c'est ce que nous allons entreprendre dans notre laboratoire.

## 2.3. Discussion générale

Ces dernières années, la modification technologique la plus importante dans l'industrie pastière est certainement l'introduction du séchage des pâtes alimentaires à haute ou à très haute température. Même si ce nouveau procédé n'est pour le moment pas appliqué, il est légitime de poser la question de savoir si cette nouvelle technologie une fois généralisée n'empêchera pas le contrôle de la teneur en blé tendre, autrement dit l'application de la législation concernant l'utilisation exclusive du blé dur pour la fabrication des pâtes alimentaires. Bien que préliminaires, nos résultats montrent qu'il est possible de développer des méthodes biochimiques permettant de détecter et même peut-être d'évaluer la teneur en blé tendre dans les pâtes alimentaires ayant subi des traitements thermiques élevés. Pour définir une méthode de dosage qui pourrait être complémentaire de la méthode officielle il serait nécessaire de poursuivre l'étude sur des échantillons préparés dans des conditions industrielles. On devrait notamment déterminer le seuil de détection ou la sensibilité puis la répétabilité et la reproductibilité des résultats ainsi que l'influence variétale et l'influence des conditions agroclimatiques sur les variétés. Ces derniers points sont particulièrement importants car comme nous l'avons vu, d'une variété à l'autre les protéines spécifiques du blé tendre ne migrent pas nécessairement au même niveau. Notons que dans le cas des trois variétés (Florence-Aurore, Moisson, Maris Huntsman) étudiées séparément ou en mélange, le dosage a été possible par les deux techniques électrophorétiques. Il serait cependant prématuré de tirer des conclusions générales sans étudier le plus grand nombre de variétés possible, ceci ayant une importance particulière pour la préparation des échantillons de pâtes témoins. Toutes ces études devraient permettre également de faire un choix entre les deux techniques électrophorétiques possibles : analyse des gliadines ou des protéines de haut poids moléculaire.

De toute évidence il ressort de ces premiers travaux que la température de séchage des pâtes n'est pas un obstacle pour détecter la présence de blé tendre dans

celles-ci. Les résultats obtenus ont été tout à fait comparables pour les trois températures de séchage (50° C, 75° C, 100° C) utilisées et cela pour les trois variétés de blé tendre.

Même une cuisson préalable ne peut empêcher la détection des blés tendres dans les pâtes alimentaires grâce à la thermorésistance des protéines étudiées, notamment de celles des  $\omega$ -gliadines. Dans le cas de l'analyse des  $\omega$ -gliadines, à cause de la dénaturation de la plupart des autres gliadines, la lecture des résultats semble être améliorée. La température de séchage préalable à la cuisson des pâtes n'a pas influencé non plus les résultats.

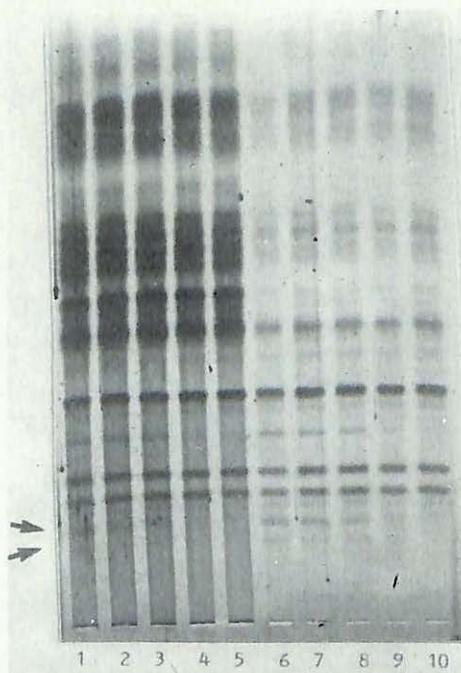
### CONCLUSION

Les résultats de l'étude préliminaire présentée montrent qu'il est possible de détecter la présence de blé tendre dans les pâtes alimentaires ayant subi des traitements thermiques élevés (séchage à très haute températures, cuisson, ou les deux) par l'analyse des  $\omega$ -gliadines ou des protéines de haut poids moléculaire. L'évaluation quantitative paraît être également possible. Des études plus approfondies devraient être entreprises pour définir les conditions optimales ainsi que la précision de la méthode.

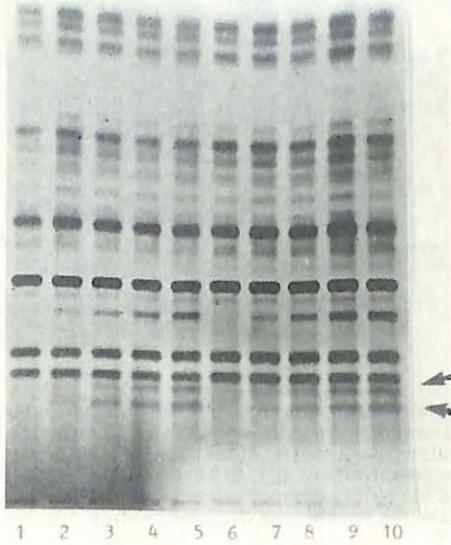
**Figure 1** - Electrophorégrammes des gliadines des blés durs (1-Valdur, 2-Bidi 17, 3-Agathé, 4-Calvin, 5-Tomclair) et des blés tendres (6-Moisson, 7-Florence Aurore, 8-Maris Huntsman). Les flèches indiquent les gliadines spécifiques des blés tendres.



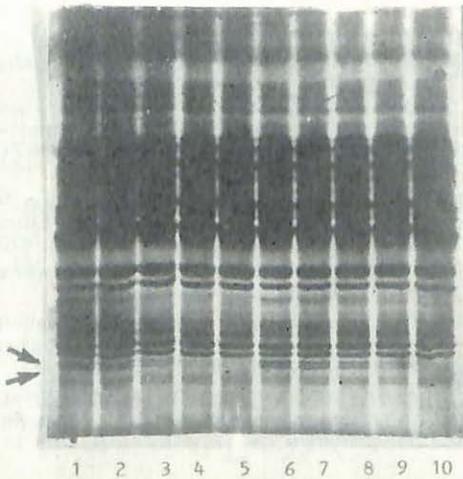
**Figure 2** - Electrophorégrammes des gliadines de pâtes alimentaires contenant du blé tendre et séchées à 100° C ou séchées à 100° C puis ayant subi une cuisson de 10 minutes. 1, 2, 3, 4 et 5 : pâtes séchées à 100°C et contenant 18, 13, 8, 3 et 0% de blé tendre respectivement. 6, 7, 8, 9 et 10 pâtes séchées à 100° C puis cuites pendant 10 minutes et contenant 18, 13, 8, 3 et 0% de blé tendre respectivement. Les flèches indiquent les gliadines spécifiques des blés tendres.

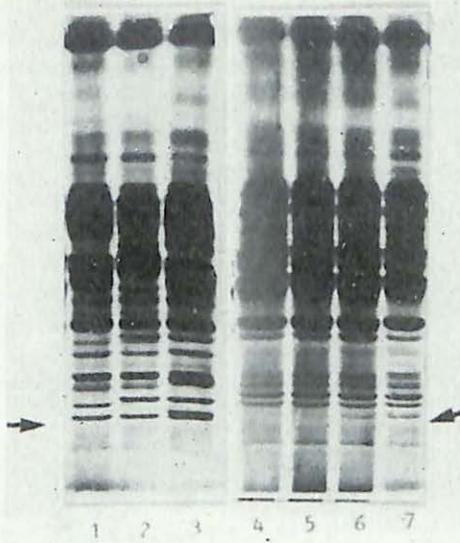


**Figure 3** - Electrophorégrammes des gliadines de pâtes alimentaires contenant du blé tendre et séchées à 50 ou à 100° C, puis ayant subi une cuisson de 10 minutes. Pâtes séchées à 50° C puis cuites pendant 10 minutes : 1-Pâtes de blé dur pur, 2, 3, 4 et 5 : Pâtes contenant 3, 8, 13 et 18% de blé tendre respectivement. Pâtes séchées à 100° C puis cuites pendant 10 minutes : 6-pâte de blé dur pur, 7, 8, 9 et 10 : pâtes contenant 3, 8, 13 et 18% de blé tendre respectivement. Les flèches indiquent les gliadines spécifiques des blés tendres.



**Figure 4** - Electrophorégrammes des protéines totales réduites extraites de blés tendres, de blés durs et de pâtes alimentaires contenant du blé tendre. 1, 2 et 3 : blés tendres var. Maris Huntsman, Moisson et Florence Aurore respectivement. 4 : Blé dur var. Valdur, 5, 6 et 7 : Pâtes alimentaires contenant 8, 13 et 18% de blé tendre respectivement. Les flèches indiquent les protéines de hauts poids moléculaires spécifiques des blés tendres.





**Figure 5** - Electrophorogrammes des protéines totales réduites, extraites de pâtes alimentaires contenant du blé tendre et séchées à 50 ou à 100° C puis ayant subi une cuisson de 10 minutes. 1, 2, 3, 4 et 5 : Pâtes séchées à 50° C et contenant 18, 13, 8, 3 et 0% de blé tendre respectivement. 6, 7, 8, 9 et 10 : Pâtes séchées à 100° C et contenant 18, 13, 8, 3 et 0% de blé tendre respectivement. Les flèches indiquent les protéines de hauts poids moléculaires spécifiques des blés tendres.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ARTAUD J., IATRIDES M-C. et ESTIENNE J., 1979 - Application de la Chromatographie Liquide Haute Pression à la détermination des blés tendres dans les pâtes alimentaires. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 72, 773, 153-157.
- AUTRAN J.C., HOULIAROPOULOS E. et LAIGNELET B., 1982 - Viscoelastic properties of bread wheat gluten : measurements, use in breeding and biochemical basis. 67 th Annual Meeting A.A.C.C., San Antonio, October, *Cereal Foods World*, 27, 8, 869, abstract n° 177.
- CUSTOT F., MEZONNET R., et CALEY m%, 1966 - Différenciation des produits au blé dur et au blé tendre, semoules et pâtes alimentaires (Etude comparée des méthodes MATVEEF et BROGNION). *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 672, 300-316
- FEILLET P. et KOBREHEL K., 1974 - Determination of common wheat content in pasta products. *Cereal Chem.*, 51, 203-209.
- GARCIA-FAURE R., MATIA E.R. et DIER T.T., 1965 a - Identificación de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias. I - Détermination espectrofotométrica en el infrarrojo. *Inst. Nat. Invest. Agron.*, 25, 385-393.
- GARCIA-FAURE R., GARCIA OLMEDO F., ABOY I.S. et ANDREU M.S., 1965b. Identificación de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias. II - Détermination colorimétrica del palmitato de sitosterol. *Inst. Nat. Invest. Agron.*, 25, 395-408.

- GUILBOT A., BREBANT R., MERCIER C., 1959 - Recherches sur les esters de stérols dans les blés et leur intérêt éventuel pour la différenciation des blés "durum" et des blés "vulgare". Besichte auf der Durum und Teigwaren Tagung. Detmold R.F.A.
- JEANJEAN M.F., DAMIDAUX R. et FEILLET P., 1980 - Effect of heat treatments on protein solubility and viscoelastic properties of wheat gluten. *Cereal Chem.*, 57, 5, 325-331.
- KOBREHEL et FEILLET P., 1975 - Identification of genomes and chromosomes involved in peroxidase synthesis of wheat seeds. *Can. J. Bot.*, 53, 2336-2344.
- KOBREHEL K. et FEILLET P., 1976 - Détection et dosage des blés tendres dans les pâtes alimentaires. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 69, 737, 47-55.
- KOBREHEL K. et GAUTIER M.F., 1974 - Variability in peroxidase isozymes in wheat and related species. *Can. J. Bot.*, 52, 755-759.
- MATWEEF M., 1952 - Détection des farines de blé tendre dans les semoules et pâtes alimentaires. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 39, 658-663.