

Programme INRA-DANONE "Blés Biscuitiers" **(1993-1997)**

Synthèse scientifique consolidée des résultats et des perspectives.

Jean-Claude AUTRAN

Compte tenu des attentes du Groupe Danone (meilleure définition des cahiers des charges, amélioration des outils d'aide à la décision, orientation de la sélection des blés tendres, synergie entre les filières biscuit et bière), l'objectif général du programme "Blés biscuitiers" était exprimé de la façon suivante :

Comprendre comment la composition de la matière première farine, ses interactions avec les autres composants et ses réactions aux procédés mis en œuvre influent sur ses caractéristiques technologiques.

Pour atteindre l'objectif, un certain nombre de programmes de collaboration ont été mis en place entre l'INRA et le Centre Jean Thèves, reposant sur 7 thèses de Doctorat. Les domaines de recherche de ces thèses couvraient les principaux points clés de la filière biscuitière et de la science du biscuit, en allant des matières premières aux procédés, à l'exception de quelques aspects que l'on avait décidé de ne pas retenir dans un premier temps (exemples : valeur meunière, granulométrie des farines). Enfin, bien que centrés sur la biscuiterie, certains programmes présentaient des liens avec la filière brasserie (interaction avec projets TEPRAL) et la filière panification (suite à l'association de Danone à un contrat passé avec les Grands Moulins de Paris) (Figure 1).

Plus précisément, les programmes touchant aux matières premières ont concerné le matériel génétique et la caractérisation génétique, biochimique et technologique des blés biscuitiers (thèse de J.-P. MARTINANT). Un effort particulier a été fait en direction de la composition protéique, des blés et des farines. D'une part dans le domaine des protéines de réserve classiques (gliadines, gluténines) que l'on a extraites exhaustivement et dosées par chromatographie et immunochimie à l'aide d'anticorps anti-peptides (thèse de Y. NICOLAS) ou par anticorps monoclonaux spécifiques des HMW-gluténines (thèse de C. DOYEN). D'autre part, dans le domaine des puroindolines, protéines présentant des propriétés tensioactives exceptionnelles, avec simultanément l'étude de leurs propriétés fonctionnelles (thèse de L. DUBREIL) et l'isolement, la caractérisation et l'expression temporelle des gènes codant pour ces protéines chez le blé et leurs homologues (hordoindolines) chez l'orge (thèse de J.-F. DIGEON).

Les programmes touchant aux procédés ont porté d'une part sur la physico-chimie du pétrissage de la pâte biscuitière, avec caractérisation de l'état physico-chimique d'une pâte biscuitière au cours du pétrissage sous l'effet d'un apport d'énergie (thermo) mécanique et d'énergie thermique (thèse d'Éric CHARUN) et, d'autre part, sur

la micro physico-chimie de la cuisson, avec étude des modifications physico-chimiques de mélanges modèles en cours de cuisson et des relations entre transformations macroscopiques et biochimiques des biscuits en cours de cuisson (thèse de S. CHEVALLIER).

L'objet de la compilation présentée ci-dessous est de dégager, du point de vue de l'INRA, la synthèse scientifique consolidée des résultats et des perspectives du programme, dont la présentation orale avait été faite lors de la réunion du 26 Mai 1998 au siège du Groupe Danone à Paris, en explicitant pour chacun des programmes :

- l'objectif scientifique
- l'état des connaissances au début du contrat
- les résultats scientifiques obtenus dans le cadre du contrat
- les conclusions et perspectives.

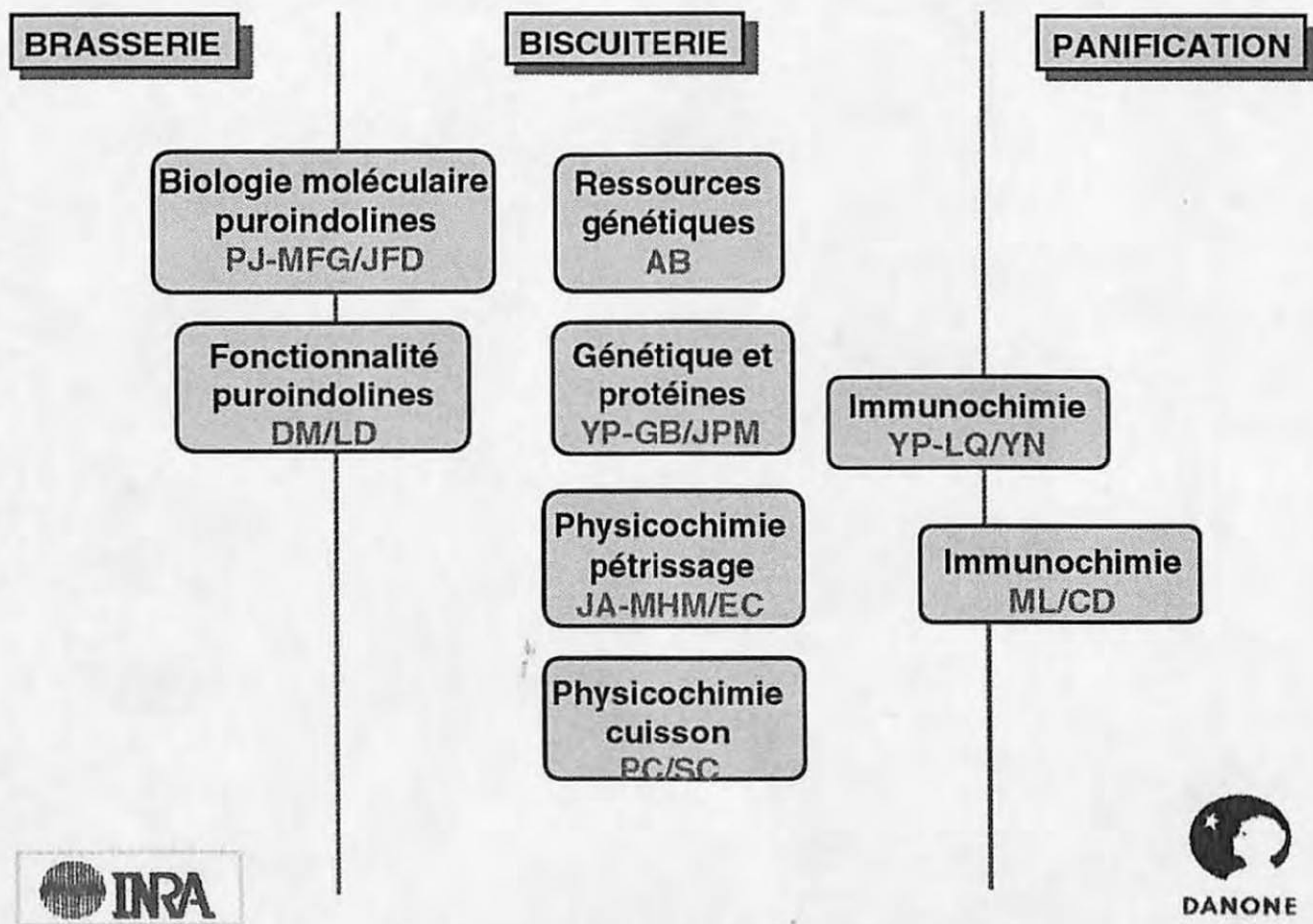


Figure 1 : Situation des différents projets, par thème et par filière

(Initiales : voir l'annuaire des participants)

Bases biochimiques génétiques et technologiques des blés biscuitiers

**Thèse de Jean Pierre MARTINANT, sous la direction de Gérard BRANLARD
Station d'Amélioration des Plantes de Clermont-Ferrand**

Objectifs

Identifier les caractéristiques biochimiques des grains et technologiques des farines qui soient discriminantes pour la qualité biscuitière, afin de développer des programmes de sélection de variétés adaptées à la biscuiterie.

État des connaissances au début du contrat

Le poids économique de la panification a orienté la sélection des variétés de blé tendre françaises vers des caractéristiques technologiques de moins en moins adaptées à la biscuiterie. Cette tendance s'est d'autant plus amplifiée que les paramètres associés à la qualité biscuitière étaient insuffisamment définis.

Résultats obtenus dans le cadre du contrat

Un biscuit sec de type laminé découpé, similaire au “goûter” fabriqué par le test du CTUC (qui est utilisé pour l’inscription des variétés biscuitières par le CTPS), a été choisi pour les besoins de ce travail. Une population de 39 variétés de blé tendre a permis la recherche des caractéristiques biochimiques et technologiques associées aux variations de réponse des farines au test biscuitier. Les paramètres mesurés à l’aide du test biscuitier sont, pour la pâte : la consistance, l’élasticité, le temps d’écoulement, la “machinabilité” et, pour les biscuits : les dimensions (longueur, largeur, épaisseur), la densité, l’aspect de surface et la résistance à la rupture. De nombreuses variables telles la dureté du grain, la composition allélique des protéines de réserve, la teneur en protéines de différentes fractions, la teneur en arabinoxylanes hydrosolubles, les mesures de rétention en eau et de viscosité de l’extrait aqueux de la farine et des mesures technologiques de pâte (mixographe) ont également été mesurées sur ces 39 variétés.

Il est apparu, par analyse de régression multiple, que *la dureté du grain était incontestablement la variable la plus explicative de la qualité biscuitière* (le pourcentage d’explication le plus fort étant observé pour la densité du biscuit : 76,6 %), suivie par la mesure de *viscosité des extraits aqueux de farine* (qui correspond approximativement à la viscosité des arabinoxylanes hydrosolubles). Les quantités de sous-unités de gluténines de haut poids moléculaire et de protéines totales sont également retrouvées dans l’explication des variables du test biscuitier.

De faibles valeurs, à la fois pour la dureté du grain et la viscosité des arabinoxylanes, sont associées à une meilleure qualité biscuitière. Une étude sur 50

lignées issues d'un croisement entre deux variétés (Floréal et Capitole), de dureté et de viscosité faibles, confirme ces résultats puisque l'on remarque que ce matériel végétal présente de faibles variations de réponse inter-lignées au test biscuitier et qu'on y note une amélioration significative de la qualité des biscuits par rapport à la population initiale de 39 variétés.

L'utilisation de 19 variétés, expérimentées sur trois lieux différents, a permis par ailleurs d'apprécier l'héritabilité des paramètres du test biscuitier et celle de variables associées à la qualité. Les valeurs d'héritabilité, relativement élevées, observées pour plusieurs variables associées à la qualité biscuitière et pour certains paramètres du test biscuitier, permettent d'envisager des programmes de sélection de variétés de blé pour la biscuiterie. Une forte héritabilité est confirmée pour la dureté du grain et est nouvellement montrée pour la mesure de viscosité de l'extrait aqueux de la farine.

Une étude génétique, à partir de deux croisements cartographiés issus de variétés parentales d'origine très diverse, a permis de confirmer le QTL majeur sur le chromosome 5DS pour la dureté (ce QTL explique 60 % et plus des variations de dureté). Un autre QTL majeur, localisé sur le chromosome 1BL, a été révélé (pour la première fois) pour la mesure de viscosité. Ce QTL explique respectivement 32 et 37 % des variations de viscosité pour les deux croisements considérés.

Ces résultats sont encourageants pour la sélection de variétés de blé tendre adaptées à la biscuiterie de type biscuit sec. Les résultats de biologie moléculaire permettent d'envisager des programmes de sélection assistée par marqueurs moléculaires.

Conclusions et perspectives

Ces travaux ont permis une amélioration importante des connaissances sur les paramètres biochimiques et technologiques de la qualité biscuitière, ainsi que sur la génétique et l'héritabilité de ces paramètres. Cela permet d'*envisager des programmes de sélection de variétés de blé adaptées la biscuiterie, en recherchant notamment des géotypes présentant à la fois une faible dureté du grain et une faible viscosité des extraits aqueux de farine.*

Publications

- MARTINANT J.-P., NICOLAS Y., BOUGUENNEC A., POPINEAU Y., SAULNIER L. and BRANLARD G. 1998. Relationship between Mixograph parameters and indices of wheat grain quality. *J. Cereal Sci.*, 27, 179-189.
- MARTINANT J.P., BILLOT A., SAULNIER L., LEROY P., BERNARD M. and BRANLARD G. 1998. Genetic analysis of water extractable arabinoxylans in bread wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, 97, 1069-1075.

NB. Chacune de ces publications a été soumise à DANONE avant qu'elle ne soit soumise à la revue internationale. D'autre part, les résultats de thèse relatifs à la valeur biscuitière, considérés comme confidentiels, ne pourront être publiés qu'à l'issue des trois années suivant le dépôt de la thèse.

Les prolamines de blé : extraction exhaustive et développement de dosages chromatographiques en phase inverse et de dosages immunochimiques à l'aide d'anticorps anti-peptides

Thèse de Yves NICOLAS, sous la direction de Yves POPINEAU

Unité de Biochimie et Technologie des Protéines, Nantes.

Objectifs

Développer des dosages immunochimiques en vue de :

- identifier et quantifier les fractions protéiques qui déterminent les potentialités technologiques d'une farine pour les industries de cuisson,
- disposer de méthodes rapides pour adapter les productions végétales aux besoins des industriels.

État des connaissances au début du contrat

Les teneurs en gliadines, sous-unités de faible poids moléculaire (SG-FPM) et sous-unités de haut poids moléculaire (SG-HPM) sont des facteurs déterminants pour la formation du réseau protéique qui constitue le gluten. Par là même, elles ont une influence prépondérante sur les propriétés rhéologiques des pâtes de farine de blé du type pâte à pain (hydratation de l'ordre de 60 %). Actuellement, il faut avoir recours à des méthodes biochimiques lourdes associant une extraction séquentielle des fractions protéiques à une méthode de dosage des protéines (dosage d'azote ou chromatographie) pour quantifier ces fractions dans les farines. L'utilisation de test immunochimiques a été envisagée, ce qui pourrait permettre de prédire simplement leurs propriétés technologiques. Pour répondre à l'objectif, ces tests doivent être spécifiques, rapides et permettre de traiter de nombreux échantillons.

Résultats obtenus dans le cadre du contrat

Les protéines de 45 échantillons de farines, correspondant à des variétés de blé actuellement utilisées en panification et en biscuiterie ont été extraites à l'aide d'un fractionnement séquentiel (albumines/globulines, protéines amphiphiles, gliadines totales, gluténines totales) et quantifiées par dosage d'azote. Parallèlement, une méthode d'extraction quasi-exhaustive des gluténines a été développée afin de déterminer par RP-HPLC les teneurs en SG-FPM et SG-HPM. Les teneurs en gliadines des 3 types (α/β , γ et ω) ont également été mesurées par RP-HPLC. Le dosage des différentes prolamines par RP-HPLC a fourni des résultats concordant avec le dosage d'azote (gliadines : $r=0,93$; gluténines : $r=0,84$, $p<1\%$) et présente l'intérêt de permettre la quantification individuelle des différents types de prolamines.

Les analyses ci-dessus ont montré que les teneurs en α/β -gliadines sont très fortement corrélées aux teneurs en gliadines totales des farines ($r= 0,97$, $p<0,1\%$). C'est pourquoi nous avons choisi de développer un dosage spécifique des gliadines à partir de la détermination des teneurs en α/β -gliadines. Nous avons utilisé pour cela des anticorps polyclonaux dirigés contre un peptide de même séquence que la partie C-terminale la plus fréquente des en a/b-gliadines. Un test ELISA compétitif a été mis au point. Sa répétabilité a été trouvée satisfaisante. Il a alors été appliqué à un échantillonnage de 22 variétés de blé. Pour 16 de ces variétés, le test ELISA a fourni des teneurs en gliadines totales raisonnablement proches de celles qui ont été déterminées par les dosages biochimiques (moins de 16 % de différence). Pour les 6 autres variétés, des écarts entre les dosages ELISA et biochimiques ont été observés, écarts pouvant être expliqués par une reconnaissance seulement partielle des α/β -gliadines par le sérum utilisé.

Une démarche analogue a été adoptée pour le *dosage spécifique des SG-FPM et des SG-HPM*. Une difficulté majeure a cependant été rencontrée. Elle provient du *caractère très fortement agrégatif de ces protéines*, y compris en présence de réducteur, pour peu que le solvant ne soit pas idéal. Précisément, les conditions de milieu nécessaire à la réalisation du test ELISA favorisent l'agrégation des sous-unités gluténines. Les extraits protéiques sont alors instables et la formation d'agrégats, même s'ils sont solubles, perturbe les dosages ELISA qui deviennent peu reproductibles. Pour résoudre ce problème une approche originale, permise par l'utilisation d'*anticorps anti-peptides* a été tentée. Diverses protéases ont été utilisées pour hydrolyser partiellement les gluténines et libérer des peptides solubles reconnus par des anticorps dirigés contre la séquence N-terminale des SG-FPM. Les résultats ont montré la validité de cette démarche qui, faute de temps, n'a cependant pas pu être menée à son terme dans le cadre de la thèse.

Conclusions

Ce travail a montré les très fortes potentialités des dosages immunochimiques appliqués aux prolamines, mais également les problèmes de mise en œuvre des tests immunochimiques quantitatifs, précis et fiables, liés aux conditions de préparation des échantillons. La recherche d'un dosage immunochimique rapide des prolamines doit donc être poursuivie car, actuellement, pour caractériser une farine, il existe soit des techniques d'analyse fine des prolamines utilisées en laboratoire de recherche et difficilement adaptables en industrie, soit des tests technologiques de contrôle des farines utilisés dans l'industrie de la panification, mais inadaptés à la biscuiterie.

Publications

NICOLAS Y., LARRE C. and POPINEAU Y. 1997. A method for the isolation of high M_r subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.*, 25 (2), 151-154.

NICOLAS Y., MARTINANT J.P., DENERY-PAPINI S. and POPINEAU Y. 1998. Analysis of wheat storage proteins by exhaustive sequential extraction followed by RP-HPLC and nitrogen determination. *J. Sci. Food Agric.*, 77, 96-102.

MARTINANT J.P., NICOLAS Y., BOUGUENNEC A., POPINEAU Y., SAULNIER L. and BRANLARD G. 1998. Relationship between mixograph parameters and indices of wheat grain quality. *J. Cereal Sci.*, 27 (2), 179-189.

NICOLAS Y., DENERY-PAPINI S. MARTINANT J.P. and POPINEAU Y. Competitive ELISA, using antipeptide antibodies, for the determination of gliadin content of wheat flours. Soumis à *J. Cereal Sci.* (07/1998).

DENERY-PAPINI S., NICOLAS Y. and POPINEAU Y. Mini-review : potentialities and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. Soumis à *J. Cereal Sci.* (08/1998).

Perspectives

L'étude de tests immunochimiques de dosage du gluten et de fractions natives ou modifiées dans les farines ou les aliments se poursuit dans un programme *Aliment Demain* en partenariat avec BLEDINA et AMYLUM. L'un des objectifs est de développer la technique de dosage sur hydrolysats limités.

Quantification immunochimique des gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) dans les blés et les farines

Thèse de Christine DOYEN sous la direction de Michel LAURIERE

Laboratoire de Chimie Biologique, Grignon

Objectifs

Mettre au point un protocole simple de quantification, à l'aide de méthodes immunochimiques, des sous-unités de gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) présentes dans les blés et les farines, qui soient utilisables pour l'analyse d'échantillons en série.

Remarques préliminaires

Le projet de quantification immunochimique des gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM), développé au Laboratoire de Chimie Biologique (LCB), à l'INRA de Grignon, résulte d'un contrat passé au niveau industriel avec le GIE CRPC des Grands Moulins de Paris (GMP) comme partenaire principal et la société LU du groupe DANONE comme partenaire associé et, au niveau INRA, avec le Laboratoire de Biochimie et Technologie des Protéines (LBTP).

Ce projet a été financé par un contrat DGAL A00122 dans le cadre de l'appel d'offre 1993 Agriculture et Aliment Demain. Il a fait également l'objet d'une bourse CIFRE cofinancée par les GMP et dont a bénéficié Mlle Christine DOYEN au LCB. La proximité des objectifs et des approches scientifiques des programmes conduits respectivement au LCB (développer des anticorps monoclonaux spécifiques des SG-HPM) et au LBTP (utilisation d'anticorps anti-peptides de gliadines) a conduit le LCB à participer à la plupart des réunions du programme Blés Biscuitiers, dont M. LAURIERE faisait partie du comité scientifique dès le départ.

État des connaissances au début du contrat

Les propriétés rhéologiques d'une pâte sont déterminées par la composition de la farine utilisée et en particulier par la nature des sous unités de gliadines et de gluténines présentes dans la farine (expression constitutive dans le grain, composition allélique caractéristique de chaque variété) et par la quantité relative de chacune de ces sous unités (qui dépend des conditions de culture).

Il n'existe cependant pas de méthode simple de quantification de ces fractions de gliadine ou de gluténine. En effet, les principales méthodes envisageables pour quantifier les différents groupes protéiques font appel à des méthodes biochimiques lourdes associant une extraction séquentielle des fractions protéiques à un dosage des

protéines (dosage d'azote ou chromatographie HPLC, ou électrophorèse associée à une densitométrie).

Il a donc été choisi de quantifier de manière immunochimique les sous unités de gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM), fractions qui sont les mieux connues pour influencer sur l'élasticité et la ténacité des pâtes. Il a fallu pour cela développer des anticorps monoclonaux spécifiques des SG-HPM, qui n'existaient pas au début du contrat et de développer des méthodes de quantification de ces protéines, inexistantes elles aussi.

Résultats obtenus dans le cadre du contrat

Une stratégie d'obtention des anticorps monoclonaux contre des protéines entières a été établie et appliquée. Un protocole d'immunisation adapté aux SG-HPM a été mis au point en utilisant la sous unité 1Dx5 et 45 clones d'anticorps parfaitement spécifiques des SG-HPM ont été obtenus et caractérisés.

Les trois quarts des clones d'anticorps sont apparus réagir à des degrés divers avec les sous unités SG-HPM codées par les trois génomes, certains réagissant toutefois plus fortement avec les sous unités de type x. Six de ces clones ont été sous-clonés et produit en plus grande quantité.

Une méthode de dosage rapide des protéines dans les farines a été mise au point et les conditions d'extraction et de solubilisation des gluténines compatibles avec les réactions avec les anticorps ont été définies. Des essais de test ELISA à un site compétitif ou deux sites (sandwich) ont montré la faisabilité d'un dosage des SG-HPM dans les farines.

Conclusions et perspectives

On retiendra les points importants suivants :

- Obtention d'anticorps spécifiques des SG-HPM pouvant être utilisés avec des méthodologies très différentes : Blot, ELISA, Biocapteur, etc.
- Démonstration de la faisabilité de la quantification des SG-HPM au moyen de tests ELISA, compétitif et sandwich, la même stratégie pouvant être appliquée aux autres groupes de protéines de réserve pour mesurer leur teneur.
- La méthodologie de quantification mettant en œuvre les anticorps doit être désormais définie avec le partenaire qui assurera la diffusion des anticorps et du kit de dosage. Plusieurs contacts ont été pris et un accord a été conclu avec BIACORE AB (Suède). Un biocapteur, BIACORE X a été acquis et est désormais disponible. Les premiers essais ont d'ailleurs montré la faisabilité de la mesure des SG-HPM à partir d'extraits bruts.

La fonctionnalité des puroindolines

Thèse de Laurence DUBREIL, sous la direction de Didier MARION

Unité de Biochimie et de Technologie des Protéines, Nantes

Objectifs

Fournir les bases moléculaires des propriétés fonctionnelles (moussantes et émulsifiantes) des puroindolines de manière à pouvoir préciser les conditions d'expression de ces propriétés fonctionnelles, notamment dans des systèmes plus complexes tels que la bière, la "liqueur de pâte" (milieu modèle de la phase aqueuse de la pâte) ou les produits céréaliers de cuisson.

État des connaissances au début du contrat

On savait que les puroindolines, polypeptides basiques dont le repliement est stabilisé par 5 ponts disulfures, présentaient, *in vitro*, de fortes activités pour les lipides polaires, et qu'elles ne pouvaient être extraites qu'en utilisant des solvants organiques ou des détergents non ioniques (TX 114). Deux isoformes avaient été isolées et séquencées : la puroindoline-a et la puroindoline-b, présentant environ 60 % d'homologie.

Il avait été montré que ces deux protéines présentaient des activités tensioactives (moussantes) exceptionnelles, notamment en association avec des polypeptides, et qu'elles avaient par ailleurs des activités antimicrobiennes intéressantes en association avec les thionines (mise en évidence d'une analogie structurale entre la puroindoline-b et une protéine animale ayant une activité gram-).

Résultats obtenus sur les puroindolines

On rappelle que, au cours d'une *période pré-doctorale*, les puroindolines avaient été déjà largement étudiées pour ce qui concerne leur purification, leurs structures primaire et secondaire, leur homologie avec la friabiline, leur variabilité génétique (variétés sans puroindoline-a), la formation de leurs ponts disulfure, leurs interactions avec les surfactants, ainsi que le rôle du domaine riche en tryptophane dans la fonctionnalité. Leurs propriétés moussantes remarquables avaient été découvertes (notamment leur capacité à prévenir la déstabilisation des mousses protéiques par les lipides, avec applications potentielles à la bière et aux protéines de blanc d'oeuf), ainsi que leurs propriétés antifongiques.

Pendant la *période doctorale proprement dite* (1994-1997), les points suivants ont été acquis :

- Les puroindolines interagissent avec les lipides polaires (phospholipides et glycolipides) du blé.
- Les propriétés moussantes des puroindolines sont très supérieures à celles d'autres protéines connues comme étant des protéines moussantes (ovalbumine).
- En présence des lipides polaires du blé et en milieu aqueux modèle ("liqueur de pâte"), la puroindoline-a a des propriétés de stabilisation des mousses supérieures à la puroindoline-b.
- Dans le grain et la pâte, les puroindolines sont localisées dans la matrice protéique du grain (albumen amylicé) et dans la couche à aleurone. Elles sont vraisemblablement situées sur la face interne de la membrane des corpuscules protéiques.
- Effet des puroindolines sur la rhéologie des pâtes.
- Effet des puroindolines sur la texture de la mie et le volume du pain.

Au cours d'une *période post-doctorale* (1997-1998), d'autres résultats ont été obtenus :

- Mise au point d'un dosage ELISA des puroindolines (a et b).
- Variabilité des teneurs en puroindolines ; relation avec dureté et qualité boulangère.
- Effet des puroindolines sur l'extensibilité et la ténacité des pâtes.
- Amélioration des rendements d'extraction des puroindolines.

Principales conclusions

1) Les puroindolines sont efficaces pour modifier la texture de produits panifiés. Elles agissent (a) en stabilisant les interfaces eau-gaz (les puroindolines sont des protéines qui forment des mousses très stables), (b) en empêchant la déstabilisation des mousses protéiques par les lipides, et (c) en entrant en synergie avec les lipides polaires du blé pour former des complexes plus stables aux interfaces eau-gaz.

2) Les puroindolines sont une composante majeure des friabilines. Elles n'interviennent pas directement dans la dureté mais sont situées à proximité du gène de dureté. La présence des puroindolines sur l'amidon des blés soft est liée à la présence de gluten résiduel qui piège des lipides et la puroindoline. Les interactions gluten-amidon au sein d'une pâte pourraient ainsi être plus importantes dans le cas des blés soft que dans le cas des blés hard.

3) Compte tenu de leur localisation histologique, une fonction biologique des puroindolines dans le repliement ou le compactage des protéines de réserve pourraient être envisagé. *In vitro* les puroindolines agissent en synergie avec les purothionines pour inhiber la croissance des microorganismes. *In vivo* cette synergie pourrait être significative puisque ces protéines sont co-localisées au niveau des corpuscules protéiques.

Perspectives

Des perspectives dans toutes les directions suivantes peuvent être envisagées :

- Fonctionnalité des puroindolines endogènes (lignées isogéniques-transgénèse)
- Puroindolines et émulsions : étude de modèles farine + corps gras
- Interactions puroindolines-polysaccharides
- Rôle des puroindolines sur les propriétés des enzymes lipolytiques et lipoxygénasiques
- Poursuite de l'étude des relations entre puroindolines et rhéologie des pâtes
- Détermination des structures 3D des puroindolines
- Étude approfondie du polymorphisme des puroindolines (protéomique)
- Recherche des QTL pour les puroindolines

Publications

DUBREIL, L., COMPOINT, J.P. and MARION, D. 1997. The interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45,108-116.

MARION D., DUBREIL L, WILDE P.J. and CLARK D.C. 1997. Lipids, lipid-protein interactions and the quality of baked products. In: *Interactions : the Keys to Cereal Quality* (Hamer R.J. and Hoseney R.C., eds), AACC, St-Paul, Minnesota, pp. 131-167.

DUBREIL L., MELIANDE S., CHIRON H., COMPOINT J.P. and MARION D. 1998. Functionality of puroindolines in breadmaking. In: *Plant Proteins from European Crops, Food and Non Food Applications* (Guéguen J. and Popineau Y., eds), Springer, pp. 229-235.

DUBREIL L., MELIANDE S., CHIRON H., COMPOINT J.P., QUILLIEN L., BRANLARD G. and MARION D. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 75, 222-229.

COMPOINT J.P., DUBREIL L., POPINEAU Y. and MARION D. 1998. Large scale and rapid purification of plant lipid binding proteins by combining triton X-114 phase partitioning and ion exchange chromatography. In: *Plant Proteins from European Crops, Food and Non Food Applications - Posters* (Guéguen J. and Popineau Y., eds), pp. 68-71.

DUBREIL L., BARRICAULT F., GABORIT T., LEGOUX M., COMPOINT J.P., QUILLIEN L., BRANLARD G. and MARION D. 1998. Immunochemical study of lipid binding proteins. In: *Plant Proteins from European Crops, Food and Non Food Applications - Posters* (Guéguen J. and Popineau Y., eds), pp. 72-76.

DUBREIL L., GABORIT T., BOUCHET B., GALLANT D.J., BROEKAERT W.F., QUILLIEN L. and MARION D. 1998. Spatial and temporal distribution of puroindolines and a non specific lipid transfer protein (ns-LTP1) in *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their *in vitro* antifungal properties. *Plant Science*, 138, 121-135.

DUBREIL L. and MARION D. Puroindolines are essential for the foaming properties of the aqueous phase of bread doughs. *Cereal Chemistry*, soumis.

DUBREIL L., GABORIT T., BOUCHET B., GALLANT D.J. and MARION D. Partitioning of puroindolines into bread doughs. An ultracentrifugation and electron microscopy study. *en préparation.*

Communications

DUBREIL L., QUILLIEN, L. and MARION, D. 1994. Wheat lipid binding proteins probed by polyclonal antibodies. *14th ICC Congress*, La Haye, Pays-Bas, 5-9 juin.

DUBREIL, L., QUILLIEN, L., COMPOINT, J.P. and MARION, D. 1994. Variability, biosynthesis, degradation and location of wheat indolines and lipid transfer proteins. *Wheat Kernel Proteins, Molecular and Functional Aspects*, Viterbo, Italie, 28-30 septembre.

DUBREIL, L., MELIANDE S. and MARION, D. 1996. Puroindolines and natural wheat flour lipids at air-water interfaces. *Sixth Meeting on Food Colloids-Proteins, lipids and polysaccharides*, Ystad, Suède, 24-26 Avril.

DUBREIL, L., BARRICAULT, F., GABORIT, T., BRANLARD, G., QUILLIEN, L., LEGOUX, M.A., COMPOINT, J.P. and MARION, D. 1996. Protéines de blé impliquées dans la fixation des lipides : dosage immunochimique et immunolocalisation. *XXIIIème Forum des Jeunes Chercheurs*, Poitiers, 2-5 juillet.

Étude des gènes codant pour les puroindolines du blé tendre et des hordoindolines d'orge

Thèse de Jean-François DIGEON, sous la direction de Philippe JOUDRIER et Marie-Françoise GAUTIER

Unité de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Montpellier

Objectifs

Isoler et caractériser les gènes codant les puroindolines et étudier leur expression temporelle et spatiale.

État des connaissances au début du contrat

A partir d'une banque d'ADNc (grain à mi-maturation) de blé tendre (*Triticum aestivum*, cv. Capitole) des clones d'ADNc codant pour la puroindoline-a et la puroindoline-b avaient été isolés (Gautier et al., 1994). La puroindoline-a et la puroindoline-b présentent 55 % de similarité, contiennent toutes les deux 10 résidus cystéine et possèdent un domaine amphiphile riche en tryptophane et résidus basiques. Les puroindolines sont synthétisées sous la forme de précurseurs contenant des extensions N- et C-terminales qui pourraient être impliquées dans leur localisation vacuolaire. Chez le blé tendre, les gènes codant pour les puroindolines sont spécifiquement exprimés dans la graine au cours du développement (12 - 36 jours après anthèse) mais ne sont pas exprimés au cours de la germination. Par contre, aucun transcrite de puroindolines n'a été mis en évidence chez le blé dur (*Triticum durum*). En utilisant les techniques d'amplification d'ADN (PCR), nous avons montré que l'absence de transcrite de puroindolines n'était pas due à une régulation transcriptionnelle mais à l'absence des gènes codant pour les puroindolines.

De plus, par PCR, la présence de gènes similaires aux gènes de puroindolines chez d'autres céréales dont l'orge, le seigle, le triticale et l'avoine avaient été mis en évidence. Le clonage et le séquençage de certains de ces gènes indiquent que la structure primaire des puroindolines est fortement conservée parmi ces céréales (Gautier *et al.*, résultats non publiés).

Résultats obtenus dans le cadre du contrat

Le promoteur du gène codant la puroindoline-b a été isolé par PCR inverse et le gène codant la puroindoline-b par criblage d'une banque génomique de blé tendre (Andain) en utilisant le clone d'ADNc pTal9B2 codant la puroindoline-b.

Le promoteur du gène de la puroindoline-b, isolé par PCR inverse, contient 1070 pb en amont de l'ATG et contient les séquences consensus de type boîtes CAAT et

TATA ainsi que d'autres séquences présentes dans les gènes exprimés spécifiquement dans les graines.

L'expression temporelle et spatiale du gène de la puroindoline-b a été étudié dans des riz transgéniques en utilisant le gène rapporteur *gus* codant la β -glucuronidase.

Pour l'analyse par délétions 5', quatre gènes de fusion traductionnelle et quatre gènes de fusion transcriptionnelle ont été réalisés. Les délétions du promoteur du gène de la puroindoline-b (-1070, -388, -210 et -124 pb en amont de l'ATG) ont été effectuées par PCR puis clonées en amont du gène *gus*.

La transformation du riz a été réalisée par bombardement de cals embryogènes de riz. Parmi les 196 plantes transgéniques analysées, 108 ont été fertiles et analysées pour leur activité β -glucuronidase (GUS).

L'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur du gène de la puroindoline-b a lieu exclusivement dans le grain, aucune activité GUS n'ayant été détectée dans les organes végétatifs. De plus, l'expression du gène *gus* est régulée au cours du développement du grain.

Une étude histochimique a montré que, dans le grain, l'activité GUS est localisée dans tous les tissus sauf au niveau de l'axe embryonnaire. La régulation du gène de la puroindoline-b semble se faire de façon indépendante au niveau de l'albumen et de l'épithélium du scutellum. La région responsable de l'expression dans l'albumen se situe entre -388 et -210 pb en amont de l'ATG et celle responsable de l'expression dans l'épithélium du scutellum entre -210 et -124 pb en amont de l'ATG.

Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus ont mis en évidence que le promoteur du gène de la puroindoline-b est un promoteur fort et graine spécifique. La mise en évidence de domaines importants pour l'expression du gène de la puroindoline-b dans le grain devra être poursuivie par une analyse plus fine de ce promoteur afin d'identifier les séquences *cis* se liant aux facteurs de transcription.

L'isolement du promoteur du gène de la puroindoline-a et l'étude de sa régulation pour la comparer à celle du gène de la puroindoline-b devront également être effectués. Cette comparaison permettra de définir des séquences communes ou spécifiques à chacun de ces promoteurs afin d'identifier les séquences de fixation des facteurs de transcription.

Publications

DIGEON J.F. 1997. Isolement du promoteur du gène de la puroindoline-b de blé tendre et analyse de sa régulation dans des riz transgéniques. Thèse soutenue le 16 Septembre 1997, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.

DIGEON J.F., GUIDERDONI E., ALARY R., MICHAUX-FERRIERE N., JOUDRIER P. and GAUTIER M.-F. 1997. Poster : A 388 bp region of a wheat *puroindoline* gene is sufficient to direct tissue-specific expression in transgenic rice seeds. 5th International Congress of Plant Molecular Biology Singapore, 21-27 September.

DIGEON J.F., GUIDERDONI E., ALARY R., MICHAUX-FERRIERE N., JOUDRIER P. GAUTIER M.-F. 1998. Cloning of a wheat puroindoline gene by IPCR and identification of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. Plant Mol. Biol., soumis

Physico-chimie du pétrissage des pâtes biscuitières

Thèse d'Éric CHARUN, sous la direction de Marie-Hélène MOREL

Unité de Technologie des Céréales et des Agropolymères, Montpellier

Objectifs

Identifier les changements physico-chimiques induits au cours du pétrissage par les différents types d'apports énergétiques et responsables de la formation et de la rhéologie de la pâte.

État des connaissances au début du contrat

La qualité technologique des blés français est peu adaptée à la production de biscuits secs laminés (qui représentent 40 % de la production biscuitière). La connaissance insuffisante des critères biochimiques qui déterminent l'aptitude des farines à la production biscuitière rend difficile la prédiction de leur comportement en biscuitière et grève, par là même, la productivité.

Jusqu'alors, le pétrissage avait surtout été approché industriellement par sa fonction de mélange, alors qu'il est entendu que le pétrissage est le siège de phénomènes physico-chimiques qui déterminent largement les qualités des produits finis.

Ainsi, l'influence de la composition biochimique et de la variabilité génétique des farines sur la formation de la pâte et sur la stabilité dimensionnelle des biscuits secs laminés reste à préciser. Il en est de même de l'incidence des interactions entre composition biochimique des farines et conditions de pétrissage et de laminage. Dans l'état actuel des connaissances, aucun outil n'est disponible pour guider le choix du sélectionneur ou orienter la conduite des lignes en fabrication.

Résultats obtenus dans le cadre du contrat

L'influence des conditions de pétrissage sur la stabilité dimensionnelle (longueur et épaisseur) des biscuits secs a été étudiée sur une ligne de fabrication pilote, instrumentée par des capteurs de force et de température. Le rôle de l'apport énergétique a pu être apprécié d'après les effets indépendants des variables vitesse et temps de pétrissage et des effets de la température finale de pâte. Cette dernière variable était ajustée indépendamment de l'apport d'énergie mécanique par régulation de la température de la double enveloppe du pétrin. Les pâtes ont été soumises à des investigations rhéologiques (empirique et fondamentale) et physico-chimiques.

D'autre part, nous avons analysé le potentiel biscuitier (test biscuitier DANONE) de farines provenant de 5 cultivars produits en conditions contrôlées par l'INRA-SAP. De façon à contrecarrer le déterminisme génétique de la dureté de l'albumen, deux diagrammes de mouture ont été utilisés. Des teneurs en amidon endommagé sensiblement équivalentes entre blés de type "soft" et "médium hard" ont ainsi pu être obtenues. Le potentiel de qualité a été mis en relation avec les caractéristiques biochimiques et physiques des farines.

Principales conclusions

1) Effet du procédé de mise en forme

L'épaisseur des biscuits dépend de l'apport d'énergie spécifique totale et du temps de pétrissage mais pas de la température. A l'opposé, la longueur des biscuits diminue avec l'augmentation de la température de la pâte et augmente avec la vitesse de pétrissage.

2) Déterminisme de la longueur des biscuits

La longueur des biscuits dépend de la température de la pâte et de la vitesse de pétrissage, mais également de la composition biochimique des farines, notamment leur teneur en macropolymères de gluténines et en amidon endommagé. La longueur ne semble pas liée à la dureté des variétés de blé.

L'augmentation de la vitesse de pétrissage conduit à l'obtention de biscuits plus longs. Deux mécanismes distincts contribueraient à cet effet.

D'une part, l'augmentation du cisaillement permet une meilleure fragmentation des amas de cristaux qui sont ainsi distribués de façon plus homogène dans la pâte. Les cristaux de matière grasse solide qui s'intercalent entre les constituants (effet lubrifiant ou "shortening") contribueraient à limiter les possibilités de liaisons entre les protéines. Les propriétés lubrifiantes du palme seraient supérieures à celles du coprah, qui donne des biscuits plus courts, probablement en relation avec la forme polymorphique et la taille des amas cristallins. La composition de la matière grasse a également un effet sur les propriétés rhéologiques de la pâte et sur son collant : avec le coprah, les pâtes sont plus sèches et plus consistantes. La composition de la matière grasse influencerait donc très probablement la répartition de l'eau entre les constituants de la farine, par l'intermédiaire de divers degrés d'interactions avec ceux-ci.

D'autre part, le cisaillement mécanique de la pâte contribue à augmenter la solubilité des macropolymères de gluténines (MPG). Or, il est maintenant clairement démontré que l'élasticité d'une pâte de farine dépend de la teneur en MPG insolubles. Une teneur initiale plus importante de la farine en MPG (cas de la variété Camp Rémy par rapport à Arminda) va provoquer une augmentation de l'élasticité de la pâte. Par

contre, la réduction en taille des MPG consécutive à leur rupture sous l'effet des forces de cisaillement qui s'en suit va contribuer à diminuer l'élasticité de la pâte.

La température de la pâte en fin de pétrissage influence négativement la longueur des biscuits. Les conséquences de l'augmentation de température de la pâte seraient grossièrement identiques quelle que soit la farine utilisée. Elle provoque la fusion des triglycérides, qui serait le phénomène initiateur d'un changement de réactivité chimique des protéines. La disparition de l'obstacle physique que constituent les cristaux de triglycérides et la rupture des interactions protéines/cristaux de triglycérides va autoriser la mise en place d'un réseau élastique tridimensionnel, repérable par l'analyse rhéologique de la pâte. Par ailleurs, la fusion des triglycérides s'accompagne d'une brutale diminution du collant de la pâte. Il est donc vraisemblable que la fusion des triglycérides accélère les transferts d'eau entre les constituants (amidon endommagé, protéines, pentosanes) jusqu'ici empêchés par les amas de triglycérides solides.

La longueur des biscuits est contrôlée par le taux d'endommagement de l'amidon et la teneur en pentosanes solubles. Toutes les variétés ne présentent cependant pas la même sensibilité vis-à-vis de l'amidon endommagé. Ainsi, la var. Arminda présente une amplitude de variation beaucoup plus importante que celle des autres variétés : elle est à l'origine des biscuits les plus longs et les plus courts. D'autre part, la var. de type "medium-hard" Thésée, bien que présentant la plus forte teneur en amidon endommagé ne donne pas les biscuits les plus courts.

Ces différences de comportement on pu être mises en relation avec la teneur en pentosanes solubles des blés. Il a été possible de prédire l'ensemble des résultats obtenus pour les 5 variétés étudiés par une équation prédictive unique : longueur = $69.49 + (0.703 * \text{Solubles Pentosanes} - 1.024) * (\text{amidon endommagé} - 19.24)$, ($r = 0.735$), la prise en compte du seul facteur amidon endommagé ne permettant pas de prédire plus de 64 % des variations de longueur.

3) Déterminisme de l'épaisseur des biscuits

Les variations d'épaisseur des biscuits ne semblent être clairement liées qu'au caractère "hard" ou "soft" des blés et, plus particulièrement, à la différence de distribution granulométrique des farines. Dans le cas de la variété soft Arminda, l'augmentation de l'apport d'énergie mécanique et du temps de pétrissage permet un meilleur développement des biscuit à la cuisson. Cependant, avec la variété "hard" Camp Rémy, aucun gain en épaisseur des biscuits n'est observé sous l'effet de l'apport d'énergie mécanique.

Les mécanismes physico-chimiques responsables des différences de comportements entre les variétés Arminda et Camp Rémy restent mal compris. Il est possible que des *différences liées aux mécanismes d'hydratation des protéines et à leur état de plastification* soient en cause. Dans ce cas, pour Camp Rémy, l'absence d'effet notable de l'augmentation de la teneur en eau de la pâte sur l'épaisseur des

biscuits serait à mettre sur le compte d'une très faible vitesse d'hydratation pour les protéines de cette farine comparativement à celles Arminda.

La *densité* des biscuits apparaît également très liée à la *dureté* de la variété (D_{50}). Les variétés donnant les biscuits les moins denses sont de type "soft. Plusieurs références anglo-saxonnes font état de résultats similaires : les variétés "hard" donnent des biscuits de plus faible épaisseur (donc de plus forte densité) et moins étalés que les variétés. D'autres facteurs biochimiques influencent la densité par l'intermédiaire de l'épaisseur : dans le cadre de ce travail, les proportions de gliadines et de pentosanes insolubles influencent négativement l'épaisseur des biscuits. Cependant ces effets ont pu se confondre avec un effet année de culture. L'influence des gliadines et de pentosanes insolubles devrait donc être confirmée sur un plus grand nombre de variétés et d'années de culture avec un meilleur découplage année/apport azoté.

Perspectives et recommandations

La maîtrise de la montée en température de la pâte au cours du pétrissage, associée à une forte intensité de pétrissage devrait permettre d'ajuster la *longueur des biscuits*. Cependant une meilleure régularité de la production pourrait être obtenue en prenant en compte les critères amidon endommagé et pentosanes solubles.

Le déterminisme de l'*épaisseur des biscuits* reste encore assez mal cerné. L'impact variétal prépondérant (effet de la D_{50}) encourage le recours à la *sélection variétale*. Des variétés de *faible dureté* doivent être recherchées. Cette sélection qui va se faire au détriment de la teneur en pentosanes totaux devra respecter la teneur en pentosanes solubles, faute de quoi des problèmes de longueur (biscuit trop long) pourraient être rencontrés.

Les mécanismes d'hydratation des farines, notamment en fonction de leur D_{50} et du type de "shortening" devraient faire l'objet de nouvelles études. De même, des renseignements pertinents pourraient être fournis par l'étude des modifications rhéologiques de la pâte en cours de cuisson, si tant est que l'on puisse mettre en parallèle l'évolution de la teneur en eau et de la température des produits avec le dégagement d'ammoniac et le développement en épaisseur des biscuits.

Publications

CHARUN E. 1997. Influence des conditions de pétrissage et de la composition biochimique des farines sur la qualité des biscuits secs laminés. Thèse de Doctorat de l'Université de Bourgogne, mention Sciences de l'Alimentation, 219p.

CHARUN E., ABECCASSIS J., CONTAMINE A.-S., ROULLAND T.-M. and MOREL M.-H. 1999. The effect of mixing conditions on semi-sweet biscuit dough characteristics and biscuit quality. Cereal Chem. (in preparation).

CHARUN E., VILLAIN A.-C, ROBERT N., CHAURAND M., ROULLAND T.-M. and MOREL M.-H. 1999. Influence of flour particle size and damaged starch on semi-sweet biscuit quality. *Cereal Chem.* (in preparation).

VERGNES B., CHARUN E., CONTAMINE A.S. and DOURNAUX J.-L. 1997. Rheological characterisation of biscuit dough. In : *Proceedings of the 1st International Symposium on Food Rheology and Structure* (E.J. Windhab and B. Wolf, eds), March 16-21, Institute of Food Science ETH, Zurich (Switzerland), pp. 193-197.

Communications

CHARUN E. 1996. Physicochimie du pétrissage de la pâte biscuitière : une approche pluridisciplinaire. Exposé au Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Bourgogne et de Franche Comté, 13-14 Juin, Dijon (France).

CHARUN E. 1996. Physicochimie du pétrissage de la pâte biscuitière : une approche pluridisciplinaire. Poster aux Journées de l'Ecole Doctorale Biologie des Systèmes Intégrés, Agronomie, Environnement. Agropolis International, Montpellier, 21-22 Octobre.

Microphysicochimie de la cuisson

Thèse de Sylvie CHEVALLIER, dirigée par Paul COLONNA

Unité de Biochimie et de Technologie des Glucides, Nantes

Objectifs

Dans l'ensemble des produits céréaliers, les pâtes de biscuits secs se distinguent par leur faible teneur en eau (de l'ordre de 20 %) et le nombre élevé d'ingrédients qui les composent. Ce travail avait pour objectif d'approfondir les connaissances sur les phénomènes et modifications chimiques et structurales ayant lieu pendant la cuisson de ces milieux peu hydratés, dans la perspective de relier les caractéristiques macroscopiques du biscuit (dimensions, couleur, humidité) de manière causale à des paramètres matière ou procédé.

État des connaissances au début du contrat

La technologie du biscuit comporte trois opérations unitaires consécutives : le pétrissage, le façonnage et la cuisson. Alors que le pétrissage a fait l'objet de travaux intenses, la cuisson n'a pas bénéficié d'études scientifiques, ni d'introduction de nouveaux procédés technologiques. Les réactions chimiques et physico-chimiques se produisant durant la cuisson sont très complexes : dénaturation des protéines, gélatinisation de l'amidon, caramélisation des sucres et réactions de Maillard, expansion de la texture par dilatation des gaz. Parallèlement, une importante déperdition d'eau a lieu par évaporation. En conséquence, seules des approches pluridisciplinaires permettent de cerner l'importance relative de chacun des paramètres cinétiques de cuisson. Or, les travaux réalisés à ce jour sont très parcellaires car ils ne s'attachent qu'à un seul composant, le plus souvent dans des conditions extrêmes d'hydratation (> 98 % d'eau). Enfin, les études en génie des procédés négligent complètement les transformations chimiques et physico-chimiques de la matière, en restreignant la cuisson à des transferts de chaleur dans un matériau homogène.

Résultats obtenus dans le cadre du contrat

Un produit industriel modèle (Petit Brun Extra) a été choisi en raison de sa simplicité. Une étude préliminaire du produit industriel a permis, d'une part, de caractériser la pâte et le biscuit à différents niveaux de structure : macroscopique (dimensions, alvéolation), microscopique (amidon, agrégats de protéines, microstructure) et moléculaire, et, d'autre part, de définir et d'optimiser les méthodes d'analyses. Deux démarches ont alors été entreprises pour suivre les phénomènes mis en jeu lors de la cuisson.

La première, mise en oeuvre au laboratoire, a consisté en l'étude des modifications physico-chimiques de mélanges modèles en cours de cuisson par des analyses enthalpique différentielle (AED), thermomécanique dynamique (ATMD) et thermogravimétrique (ATG). Les cuissons ont été réalisées avec une vitesse de chauffage lente (3°C/min), d'une part, afin de mieux discriminer les phénomènes observables par les différentes méthodes d'analyses et d'établir ainsi leur chronologie, et, d'autre part, parce qu'il est actuellement impossible de reproduire les vitesses de montée en température rencontrées dans les fours industriels (entre 50 et 20°C/min pendant les 3 premières minutes de cuisson).

La seconde démarche, consistant en la fabrication de biscuits en four pilote dans différentes conditions de cuisson, devait permettre de mettre en relation les transformations macroscopiques (température, teneur en eau, variations dimensionnelles) et les transformations biochimiques des biscuits, en cours de cuisson. Cette partie de l'étude a nécessité le développement et l'optimisation de méthodes pour l'échantillonnage au cours de la cuisson et pour le suivi des caractéristiques macroscopiques, en particulier les variations dimensionnelles enregistrées en continu grâce à un système vidéo relié à un micro-ordinateur.

La caractérisation aux différents niveaux de structure (macroscopique, microscopique et moléculaire) de la pâte et des biscuits mettent en évidence les principaux changements induits par la cuisson.

Ceux-ci se traduisent au *niveau macroscopique* par :

- (1) un développement, lié à l'expansion du biscuit, qui a lieu dans le premier tiers de la cuisson. Il induit une diminution importante de la masse volumique associée à la mise en place d'une structure poreuse ouverte.
- (2) un séchage correspondant à la diminution de la teneur en eau jusqu'à 1 % environ, qui a lieu principalement durant les deux premiers tiers de la cuisson.
- (3) une coloration, correspondant à une modification de la couleur de surface du biscuit et traduite par la diminution de la clarté L^* , qui se développe durant les deux derniers tiers de la cuisson.

Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Manley (1991), mais différent de ceux de Wade (1988) qui rapporte une expansion et une coloration plus tardives.

Ils se traduisent aux *niveaux microscopique et moléculaire* par :

- (1) une insolubilisation des protéines qui intervient dans le deuxième tiers de la cuisson, c'est-à-dire après la phase de développement ; elle correspond à l'augmentation de température au-dessus de la valeur seuil de début de réticulation (85°C), mais aucune relation directe entre la teneur en protéines insolubles et

l'évolution des caractéristiques macroscopiques du biscuit, en particulier l'arrêt du développement, n'a pu être établie.

(2) un faible endommagement de l'amidon, qui a lieu essentiellement durant le premier tiers de la cuisson, étant ensuite limité par le départ d'eau important (séchage).

(3) la disparition des sucres réducteurs, à la surface du biscuit, qui intervient dans les deux derniers tiers de la cuisson, en parallèle avec le développement de la coloration. Un modèle linéaire simple reliant teneur en sucres réducteurs et clarté a été obtenu.

La cuisson conduit à un produit hétérogène. En effet, les modifications biochimiques interviennent sous l'action de la température, mais l'eau joue également un rôle prépondérant dans les transitions thermiques qui ont lieu en cours de cuisson (transitions de phase des glucides, amidon et sucres, et des protéines). Les transformations biochimiques sont donc gouvernées par le couple température - teneur en eau. De plus, toutes les parties du produit ne sont pas à la même température à un instant donné et ne restent pas dans l'intervalle de température requis pour une réaction donnée pendant le même laps de temps, d'où l'importance des profils internes de température et teneur en eau dans le produit. L'idéal serait d'obtenir une cartographie de la température et de la teneur en eau dans le produit en cours de cuisson, mais la faible taille du biscuit rend impossible de telles mesures. La mise en œuvre de modèles théoriques permettant de prédire l'évolution des profils de température et de teneur en eau dans le biscuit en cours de cuisson serait alors une aide précieuse pour comprendre et prévoir les modifications biochimiques qui ont lieu. Les travaux menés par ailleurs dans le cadre du projet dans lequel s'inscrit cette étude, en particulier ceux concernant la modélisation des modifications macroscopiques pourront sans doute apporter des informations complémentaires sur ces évolutions. Un modèle à deux compartiments, l'un représentant la surface supérieure colorée, et l'autre, le cœur du biscuit, choisi dans ce travail est recommandé pour toute modélisation.

Le lien entre les modifications physico-chimiques suivies par AED, ATMD et ATG et les modifications macroscopiques obtenues lors des cuissons sur pilote est délicat en raison des conditions expérimentales très différentes. Non seulement les vitesses de montée en température, mais la taille des échantillons et les conditions d'hydratation induisent une évolution différente du couple température - teneur en eau. Cependant, ces analyses de laboratoire ont permis de déterminer le rôle et les interactions des différents constituants. En raison de la complémentarité de ces méthodes, les événements thermiques associés à la fusion des matières grasses et aux réactions de neutralisation et de décomposition des poudres levantes ont été identifiés et associés à des modifications macroscopiques des échantillons. Ces analyses ont également montré le rôle important des sucres au niveau moléculaire (interactions avec l'amidon). De plus, mettant en œuvre des mélanges modèles, elles peuvent trouver des applications dans des études sur d'autres types de produits céréaliers.

La synthèse des différents événements identifiés au cours de ces travaux est présentée sur la cinétique thermique du biscuit au cours de la cuisson et du

refroidissement et sur la courbe de levée du biscuit au cours de la cuisson. Les températures de transition vitreuse (T_g) notées pour les différents constituants correspondent à des passages de l'état caoutchoutique à l'état vitreux en raison de la diminution de teneur en eau qui accompagne l'élévation de température.

La phase de développement est régie par la production de gaz de décomposition des poudres levantes (BCS, puis BCA) et dans une moindre mesure par l'évaporation de l'eau. Cette production de gaz est positivement corrélée à la vitesse de montée en température gouvernée par les paramètres de cuisson (température, humidité et vitesses d'air). La croissance des alvéoles résulte de l'équilibre entre l'augmentation de la pression induite par la production de gaz, la perméabilité des parois alvéolaires aux gaz et la résistance liée aux propriétés rhéologiques évolutives de la pâte. L'arrêt de cette phase correspond à l'épuisement des poudres levantes, et, lorsque la température est suffisante, à la percolation de vapeur d'eau et non à une rigidification de la matrice qui pourrait être due à la réticulation des protéines ou au passage de la transition vitreuse d'un ou plusieurs constituants de la matrice. L'amidon étant essentiellement sous forme granulaire, le passage à l'état vitreux de ses phases amorphes ne semble pas affecter l'expansion.

Le séchage, étroitement lié à l'augmentation de température et gouverné par les conditions de cuisson, induit la vitrification de la phase amorphe des grains d'amidon, puis celle des protéines. Il correspond à l'augmentation importante de la pression de vapeur d'eau saturante vers 100°C à l'origine du phénomène de percolation qui provoque la rupture des parois alvéolaires et l'effondrement du biscuit. De plus, le séchage limite l'endommagement de l'amidon au-delà du deuxième tiers de la cuisson (concordance entre vitesse de séchage maximale et taux d'endommagement maximal de l'amidon). A la fin du séchage, l'épaisseur du biscuit est à peu près stabilisée, mais ce n'est que pendant le refroidissement que la structure du biscuit sera définitivement fixée par la vitrification du saccharose.

La coloration de la surface du biscuit, traduite par la diminution de la clarté, a été reliée à la disparition des sucres réducteurs dans le compartiment représentant cette surface. En l'absence de mesure directe de la température de surface du biscuit au cours de la cuisson, ou d'un modèle permettant d'estimer cette valeur, ces événements n'ont pu être placés sur les cinétiques représentées.

L'ensemble des modifications chimiques et structurales correspondent à des changements d'état des constituants (fusion, vaporisation, agrégation, transition vitreuse) dont la sensibilité aux paramètres du procédé diffère. Sur cette base, deux classes de constituants peuvent être définies :

- 1) les constituants à l'origine de la production de gaz : poudres levantes et eau. Leurs transformations, gouvernées par les vitesses de montée en température et de séchage, affectent essentiellement la phase de développement. Leur rôle est transitoire puisqu'ils ne se retrouvent pas dans le produit fini (à l'exception d'un faible pourcentage d'eau), mais indispensable à la formation de la structure du biscuit.

2) les autres constituants : lipides, amidon, protéines et sucres. Leurs transformations, plutôt gouvernées par le couple (température, teneur en eau) affectent les propriétés mécaniques de la matrice. Cependant, aucune corrélation directe n'a pu être mise en évidence entre ces transformations et la phase de développement du biscuit. En revanche, elles interviennent dans la fixation de la structure.

Le rôle de la variabilité biologique sur ces constituants et ses conséquences sur leurs transformations au cours de la cuisson restent à étudier.

Perspectives

Ce travail a permis d'expliciter les transformations macroscopiques observées lors de la cuisson des biscuits par certaines modifications structurales et chimiques des constituants de la pâte et de faire le lien avec les variables du procédé (température, teneur en eau du biscuit). Cependant, bien que les résultats obtenus sur les modifications physico-chimiques des pâtes biscuitières en cours de cuisson permettent de mieux comprendre les transformations macroscopiques qui accompagnent la cuisson, la compréhension du développement de la structure du biscuit ouvre plusieurs perspectives :

- *Cartographie température - teneur en eau du biscuit*. Les contraintes géométriques et d'environnement imposent une double approche par modélisation et mesure expérimentale. G. TRYSTRAM est certainement le plus compétent pour traiter cette question.

- *Matières grasses* : point majeur, pour lequel Jean Thèves a d'indiscutables atouts.

- *Comportement hydrothermiques des protéines du gluten et des sucres* : T_g, dénaturation, relaxations, réactivité chimique, diffusivité. Ce thème pourrait être traité à Nantes qui possède les compétences en physico-chimie, le volet protéines étant fondé à partir des compétences d'Y. POPINEAU et J. LEFEBVRE.

- *Développement d'une mousse solide : nucléation, alvéolage, croissance, disproportionation, coalescence*. Ce thème pourrait être traité à Nantes qui possède les compétences en physico-chimie et transitions thermiques, le volet analyse d'images et microscopie étant abordable par les compétences de M.-F DEVAUX et B. BOUCHET.

- *Dégagement gazeux des poudres levantes : chimie en milieux condensés*. Il faudra trouver un vrai chimiste.

Publication :

CHEVALLIER S. 1998. Contribution of major ingredients during baking of biscuit dough systems. Workshop on Biopolymer Science - Food and Non Food Applications, 28-30 September, Montpellier (France).

Conclusion générale

Ce programme a certainement permis de réaliser un important progrès en science du biscuit comme en témoignent les six thèses brillamment soutenues devant l'Université et les publications scientifiques parues ou à paraître.

Du point de vue de l'INRA, les objectifs scientifiques généraux du programme ont été globalement atteints sachant que, sur chacun des thèmes étudiés, il y a eu une réelle acquisition de connaissances, ce qui ne signifie pas que toutes les bases ou tous les mécanismes de la qualité du biscuit soient aujourd'hui absolument clarifiés.

A l'issue du programme, on comprend mieux la fonction de plusieurs constituants et on sait mieux caractériser la matière première et le produit fini. On a clairement précisé les potentialités et les limites d'application des méthodologies étudiées. On connaît mieux l'influence de différents paramètres du procédé sur les caractéristiques de la pâte biscuitière et sur la qualité du biscuit et de nombreuses perspectives d'application ont été tracées.

Par exemple, au niveau des *matières premières*, on a aujourd'hui une meilleure connaissance des paramètres biochimiques et technologiques de la qualité biscuitière, ainsi que de la génétique et de l'héritabilité de ces paramètres. Cela permet d'envisager des programmes de sélection de variétés de blé adaptées la biscuiterie, en recherchant notamment des génotypes présentant à la fois une faible dureté du grain et une faible viscosité des extraits aqueux de farine. Cela doit permettre également de mieux préciser le contenu des cahiers des charges.

De même, la plupart des difficultés de mise en œuvre des *microtests de dosage* des protéines, difficultés notamment liées aux conditions de préparation des échantillons, ont été surmontées. Le meilleur choix entre plusieurs stratégies de fractionnement et de quantification des protéines (solubilité, HPLC, immunochimie blot ou ELISA, etc.) peut désormais être fait sur la base d'un dossier expérimental bien étayé.

Les avancées concernant la famille protéique des *puroindolines* méritent d'être soulignées à la fois au plan de la connaissance de leurs propriétés fonctionnelles (formation de mousses très stables et de complexes stables aux interfaces eau-gaz, accroissement de la ténacité des pâtes, lien avec le déterminisme de la dureté des grains, etc.) et de leurs mécanismes d'expression (isolement et description du promoteur de la puro-b), avec des retombées prévisibles dans plusieurs filières céréalières. Des perspectives très nombreuses et diverses ont ainsi été proposées (exploitation de la fonctionnalité des puroindolines endogènes, des interactions puroindolines-polysaccharides, effet sur les propriétés des enzymes lipolytiques et lipoxygénasiques, caractère inhibiteur de la croissance des microorganismes, maîtrise de l'expression temporelle et spatiale des puroindolines dans des céréales transgéniques, etc.).

Dans plusieurs cas, naturellement, les résultats ne sont pas immédiatement transférables et les perspectives envisagées passent par une *poursuite des recherches* dans des cadres restant à définir. A titre d'exemple, il serait ainsi souhaitable de parfaire la validation des marqueurs de la qualité biscuitière dans des programmes de sélection en grandeur réelle, de poursuivre simultanément les travaux de développement de programmes de sélection assistée par marqueurs moléculaires et d'affiner le développement d'un test immunochimique rapide des prolamines avec un partenaire susceptible de diffuser un kit de dosage. Également, l'étude des puroindolines mérite d'être poursuivie sur des modèles plus complexes (farine + corps gras), en vue de mieux préciser les relations entre puroindolines et rhéologie des pâtes, d'étudier leurs structures 3D, leur polymorphisme (protéomique), d'en identifier des QTL, d'isoler le promoteur du gène de la puro-a, etc.

En matière de *procédés biscuitiers*, un travail scientifique considérable a été accompli, bien que cela ne se soit pas encore réellement traduit en termes de publications puisque la soumission d'un certain nombre de manuscrits a été repoussée jusqu'à la date d'expiration du délai de confidentialité.

Ainsi, au niveau de la *formation de la pâte biscuitière*, les relations entre les valeurs d'épaisseur, de longueur et de densité des biscuits et les paramètres : apport d'énergie spécifique totale, temps ou vitesse de pétrissage, température, et composition biochimique des farines (teneur en macropolymères de gluténines et en amidon endommagé) et dureté des blés ont été très bien clarifiées. Des solutions technologiques permettant la maîtrise de la longueur et de l'épaisseur des biscuits ont été proposées en jouant sur le couple température x intensité du pétrissage, ceci en interaction étroite avec le choix de la matière première (dureté, amidon endommagé, pentosanes solubles).

Comme, toutefois, les mécanismes physico-chimiques responsables des différences de comportements entre variétés restent encore mal compris, on a suggéré de se concentrer désormais sur l'étude des *mécanismes d'hydratation des farines* (notamment en fonction de leur D50 et du type de "shortening") et de *l'état de plastification des protéines*.

En matière de *cuisson des biscuits*, les changements induits à chacune des phases du procédé et chacun des phénomènes observés (expansion, séchage, coloration) ont été décortiqués en termes de changements aux plans macroscopique, microscopique, moléculaire, physico-chimique, rhéologique, transition des constituants, en distinguant bien les constituants à l'origine de la production de gaz et ceux affectant les propriétés mécaniques et la fixation de la structure du biscuit.

Bien que la variabilité biologique de ces constituants et ses conséquences sur leurs transformations au cours de la cuisson, restent à étudier, le travail accompli a permis une acquisition considérable de connaissances au plan de la compréhension des transformations macroscopiques qui accompagnent la cuisson des biscuits. Aller plus loin en matière de compréhension et de maîtrise du développement de la structure du

biscuit nécessite cependant une poursuite des recherches dans les différentes directions qui ont été suggérées (cartographie température - teneur en eau, physico-chimie, transitions thermiques, dénaturation, interactions des protéines, des sucres et des matières grasses, chimie des poudres levantes en milieux condensés, etc.

En résumé, le programme s'est avéré très positif en matière d'acquisition de connaissances au sein de chacun des thèmes étudiés. Cela était une condition nécessaire puisque le programme reposait principalement sur un ensemble de thèses de doctorat et se devait de couvrir de la recherche de nature académique. Par ailleurs, ce programme a été conduit sur quatre sites géographiques différents, dans des unités de recherche appartenant certes au même Institut mais ayant des stratégies locales et des cultures scientifiques sensiblement différentes. Cette structure, efficace pour l'avancement de thèmes de recherches pointus ou bien délimités, ne pouvait peut-être pas permettre simultanément d'identifier les résultats opérationnels ou transférables à court ou moyen terme à des chaînes industrielles. Il ressort d'ailleurs que l'exploitation pratique de certains des résultats obtenus semble encore nécessiter une poursuite des recherches dans différentes directions, dans un cadre qui reste à définir, mais qui, si elle visait clairement à des retombées appliquées, devrait se faire au sein d'un (ou de plusieurs) programme(s) structuré(s) et managé(s) différemment de celui qui a été réalisé dans la période 1993-1997.

Jean-Claude AUTRAN
INRA, Unité Technologie des Céréales
et des Agropolymères, Montpellier

29 Janvier 1999