



**HAL**  
open science

**Suivi simultané de la consommation d'oxygène et de la consistance des pâtes de farine de blé à l'aide d'un pétrin instrumenté (le sitoxygraphe) : tentative d'explication biochimique et rhéologique. Application à l'ajout de laccases**

Loïc Levavasseur

► **To cite this version:**

Loïc Levavasseur. Suivi simultané de la consommation d'oxygène et de la consistance des pâtes de farine de blé à l'aide d'un pétrin instrumenté (le sitoxygraphe) : tentative d'explication biochimique et rhéologique. Application à l'ajout de laccases. Sciences du Vivant [q-bio]. AgroParisTech, 2007. Français. NNT : 2007AGPT0086 . pastel-00004527

**HAL Id: pastel-00004527**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00004527>**

Submitted on 13 Jan 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE

ABIES

Agriculture – Alimentation – Biologie – Environnement – Santé

2007

Thèse de **DOCTORAT**

Spécialité : **Sciences alimentaires**

par

**Loïc LEVAVASSEUR**

Soutenue le 3 Avril 2007

**SUIVI SIMULTANÉ DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DE LA  
CONSISTANCE DES PÂTES DE FARINE DE BLÉ À L'AIDE D'UN PÉTRIN  
INSTRUMENTÉ (LE SITOXYGRAPHE) : TENTATIVE D'EXPLICATION  
BIOCHIMIQUE ET RHÉOLOGIQUE. APPLICATION À L'AJOUT DE  
LACCASES.**

À AgroParisTech, Massy

Devant le jury composé de :

|                    |   |
|--------------------|---|
| Rapporteur         | Monsieur B. CUQ (ENSA-INRA, Montpellier)  |
| Rapporteur         | Monsieur G. DELLA VALLE (INRA, Nantes)    |
| Examineur          | Monsieur J.-L. BARET (Groupe Soufflet)    |
| Examineur          | Monsieur B. LAUNAY (AgroParisTech, Massy) |
| Directeur de thèse | Monsieur J. NICOLAS (CNAM, Paris)         |
| Invitée            | Madame F. VERTÉ (Groupe Puratos)          |

*Laboratoire* : Chaire de Biochimie Industrielle et Agroalimentaire

*Adresse* : CNAM – 292 rue Saint-Martin – case 306 – 75141 PARIS CEDEX 03

---

---

---

## Remerciements

Cette thèse a été réalisée à la Chaire de Biochimie Industrielle et Agroalimentaire du Conservatoire National des Arts et Métiers sous la direction de Messieurs les Professeurs Jacques NICOLAS et Jacques POTUS.

Je tiens à remercier Monsieur NICOLAS de m'avoir accueilli dans son équipe et encadré tout au long de ces trois années. Merci pour l'Exemple que vous m'avez donné. Vous m'avez apporté énormément et je suis vraiment très fier d'avoir été votre disciple. Votre passion, votre liberté et votre simplicité sont belles à voir.

Merci à Monsieur POTUS pour m'avoir encadré, encouragé, soutenu, etc.. Les discussions, les incursions dans votre bibliothèque, les conseils ont participé grandement à la réussite de ma thèse. Je dois dire que la complémentarité du tandem NICOLAS-POTUS est remarquable et assez atypique !

Ce travail a été financé par les Groupes SOUFFLET et PURATOS dans le cadre d'une convention CIFRE. Je tiens à cette occasion à remercier chaleureusement M. Jean-Luc BARET, directeur scientifique du Groupe SOUFFLET et M. Filip ARNAUT, directeur de la recherche fondamentale du Groupe PURATOS, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me confiant la responsabilité de ce projet, pour l'encadrement de mon travail et m'avoir sensibilisé aux contraintes du monde industriel.

Merci à Monsieur LAUNAY d'avoir accepté d'être mon professeur référant auprès d'AgroParisTech (ex-ENSIA) et d'avoir eu un œil critique sur le travail réalisé.

Mes remerciements s'adressent également à Messieurs Guy DELLA VALLE de l'INRA de Nantes et Bernard CUQ de l'ENSA (SupAgro) de Montpellier pour avoir accepté cordialement de juger ce travail.

A l'ensemble de membres du jury, merci pour vos critiques constructives et les discussions qui en ont découlées. Elles vont constituer une source importante d'idées pour les projets futurs.

Je tiens tout particulièrement à remercier Hugues ROBERT, puis Jocelyn ROUILLE, mes responsables successifs au sein du département de recherche et développement de MOULINS SOUFFLET, ainsi que Monsieur Gérard BLOCH, responsable commercial ainsi que Monsieur Jacques GEORIS et

---

Madame Fabienne VERTE responsables de la division recherche appliquée du Groupe PURATOS pour avoir participé à l'évolution de ce travail.

Je tiens aussi à remercier Alain SOMMIER, sans qui l'instrumentation du pétrin n'aurait pas été aussi rapide, pertinente et performante. Je retiendrai des moments de travail très appréciables où détente et bon boulot faisaient bon ménage. Je suis très heureux d'avoir mis un pied dans le domaine de l'instrumentation et de la programmation sous labview en ta compagnie et celle de Christophe.

Je tiens à remercier M. Christian Hubert, chef boulanger au fournil de Corbeil pour son aide, son avis et la toute première évaluation des pâtes pétries au sitoxygraphe, qui ont permis de valider beaucoup de paramètres en un temps record et ont servis de base à tous les pétrissages suivants ! J'en profite également pour remercier le personnel du fournil de Corbeil avec qui les quelques essais de panification ont toujours été réalisés dans la bonne humeur. La confrontation du savoir-faire boulanger avec mes connaissances biochimiques étaient toujours très instructives.

Un petit mot à l'intention de MM Jean-Jacques BONNET & Chouki ZERROUKI de la chaire de Physique du Cnam, pour votre aide sur la mesure de pression et la fourniture des capteurs en dépannage « express ». Vous avez immédiatement compris l'urgence d'un thésard en fin de thèse qui cherche une solution, et vous êtes rendus disponibles et tenus à l'écoute de mes interrogations. Je suis très sensible à tout cela et vous en suis très reconnaissant. La multidisciplinarité du Cnam a du bon, qu'on se le dise.

M. DRAPRON, j'ai particulièrement adoré vos passages trop courts au laboratoire, et les discussions que nous avons pu avoir autour du sitoxygraphe étaient riches de toute votre expérience de chercheur et de metteur au point du bioréacteur. Merci, Monsieur.

C'est avec une grande émotion que je remercie l'ensemble du personnel de la Chaire de Biochimie. Qu'il est difficile de ne retenir que quelques mots à coucher sur le papier pour vous dire un grand MERCI ! J'ai passé trois années et demi vraiment magnifiques. Par les échanges scientifiques et pas scientifiques du tout, vous avez contribué chacun à votre manière à ma réussite personnelle, je ne l'oublierai pas. Mes amis, j'espère vous revoir très bientôt !

De même, un grand merci à tous les stagiaires que j'ai encadré pendant cette thèse.

---

Que fait-on sans les amis ? pas grand chose à mon avis. Merci Laurence de m'avoir hébergé pendant les premières semaines, Guigui de m'avoir écrit la première Macro, que j'ai sauvagement copié et décliné sous toutes ses formes, Momo de m'avoir « dépanné » de ton « costard d'avocat », Louise pour l'invitation à une semaine de rédaction en vacances, Aurélien et Marine pour avoir proposé de relire la pavé et les pauses apéritives permettant de décompresser, Pierre-Tristan le pas triste, j'ai bien aimé notre petite période ensemble au labo. Merci surtout d'avoir partagé des bons moments. Je ne voudrais pas oublier tous les autres, Marie, Matthieu, les toulousains (Maxou, Reno, Sylvestre, *etc.* et toute la troupe), Amélie, Alex et Clémence, pour les petits mots d'encouragements, tous des gens sur qui on peut compter !

Enfin, merci à ma famille. Papa et maman, ça y est ! Mes études sont terminées, et vous pouvez être fiers, vous êtes à l'origine de beaucoup de choses qui me sont arrivées !. Merci aussi à mes beaux-parents, j'apprécie votre compagnie, votre culture de la fête et votre esprit entreprenant. Merci à tous les quatre pour les dépannages au pied-levés !

Le mot de la fin est pour ma petite famille. Sandra, ma chérie, merci d'avoir été là, tout simplement dans les tous les moments qu'ils soient plus difficiles ou plus faciles. Tu m'as fait garder les pieds sur terre tout au long de ces trois années. Je crois que nous avons encore de grands moments à vivre tous les deux, enfin ... trois, .....(quatre, cinq (!), qui sait ce que la vie nous réserve ?). Tu m'as rendu le plus heureux de la terre quand nous avons eu Lilla. Et toi, ma grande fille, ton « papa Loïc », il t'aime très fort... comme ça !

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>TRAVAUX ANTERIEURS.....</b>   | <b>18</b> |
| 2.1      | GENERALITES : PLACE DU PETRISSAGE DANS LA PANIFICATION .....   | 20        |
| 2.1.1    | <i>Etapas générales de la panification .....</i>   | 24        |
| 2.1.2    | <i>Procédés de pétrissage et types de pétrins utilisés .....</i>   | 26        |
| 2.2      | ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES VISCOELASTIQUES DES PATES DE FARINE DE BLE<br>28                             |           |
| 2.2.1    | <i>Appréciation de la qualité des pâtes .....</i>  | 32        |
| 2.2.2    | <i>Outils de caractérisation rhéologique.....</i>  | 32        |
| 2.2.2.1  | Rhéologie dynamique (faibles déformations) .....   | 34        |
| 2.2.2.2  | Rhéologie aux grandes déformations .....   | 36        |
| 2.2.2.3  | Instrumentation des pétrins pour la caractérisation des pâtes boulangères..                                  | 40        |
| 2.2.3    | <i>Rhéofermentomètre (outil de mesure de la production et de la rétention de<br/>dioxyde de carbone.....</i> | 44        |
| 2.3      | MODIFICATIONS BIOPHYSICOCHIMIQUES PROVOQUEES PAR LE PETRISSAGE.....  | 46        |
| 2.3.1    | <i>Rôle des transferts énergétiques .....</i>  | 46        |
| 2.3.1.1  | Apport d'énergie mécanique .....   | 46        |
| 2.3.1.2  | Energie absorbée dans la pâte, énergie dissipée par celle-ci.....  | 48        |
| 2.3.2    | <i>Rôle des composants de la pâte lors du pétrissage.....</i>  | 50        |
| 2.3.2.1  | Levures .....  | 50        |
| 2.3.2.2  | Eau.....   | 50        |
| 2.3.2.3  | Matières minérales .....   | 52        |
| 2.3.2.4  | Chlorure de sodium (NaCl) .....  | 52        |
| 2.3.2.5  | Glucides et polysides.....   | 52        |
| 2.3.2.6  | Protéines .....  | 58        |
| 2.3.2.7  | Lipides .....  | 62        |
| 2.3.2.8  | Acides phénoliques .....   | 62        |
| 2.3.2.9  | Oxygène .....  | 64        |
| 2.4      | INTERACTIONS BIOCHIMIQUES AU SEIN DE LA PATE.....  | 64        |
| 2.4.1    | <i>Développement du réseau protéique de gluten – échanges thiols (SH) /<br/>disulfures (SS) .....</i>        | 66        |
| 2.4.2    | <i>Interactions pentosanes-protéines.....</i>  | 66        |
| 2.4.3    | <i>Réactions enzymatiques intervenant lors du pétrissage.....</i>  | 68        |
| 2.4.3.1  | Réactions d'oxydoréduction.....  | 68        |
| 2.4.3.2  | Réactions d'hydrolyse .....  | 78        |
| 2.4.4    | <i>Effets des améliorants lors du pétrissage.....</i>  | 80        |
| 2.5      | IMPORTANCE DE L' AERATION ET DE L' OXYGENATION DE LA PATE LORS DU<br>PETRISSAGE .....                        | 82        |
| 2.5.1    | <i>Aération des pâtes pendant le pétrissage.....</i>   | 82        |
| 2.5.2    | <i>Que représente et traduit la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte ?.....</i>                           | 82        |
| 2.6      | LES LACCASES, UN AMELIORANT POTENTIELLEMENT INTERESSANT EN PANIFICATION<br>86                                |           |
| 2.6.1    | <i>Nomenclature et réactions catalysées .....</i>  | 88        |
| 2.6.2    | <i>Origine .....</i>   | 88        |
| 2.6.3    | <i>Structure moléculaire .....</i>   | 88        |
| 2.6.3.1  | Site actif des laccases .....  | 88        |
| 2.6.3.2  | Mécanisme d'oxydation par la laccase.....  | 90        |
| 2.6.4    | <i>Mesure de l'activité laccasique.....</i>  | 90        |
| 2.6.5    | <i>Spécificité envers le substrat phénolique .....</i>   | 94        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 2.6.6    | <i>Systèmes médiateurs</i> .....  | 96         |
| 2.6.7    | <i>Influence des paramètres physico-chimiques</i> .....   | 96         |
| 2.6.7.1  | pH optimum.....   | 96         |
| 2.6.7.2  | Température .....   | 96         |
| 2.6.7.3  | Inhibiteurs.....  | 98         |
| 2.7      | APPLICATIONS TECHNOLOGIQUES DES LACCASES.....   | 98         |
| 2.7.1    | <i>Valorisation des polysaccharides</i> .....   | 100        |
| 2.7.2    | <i>Applications industrielles</i> .....   | 102        |
| 2.7.2.1  | Traitement des eaux usées.....  | 102        |
| 2.7.2.2  | Stabilisation des boissons.....   | 102        |
| 2.7.2.3  | Industries textiles, des colorants, de la pâte à papier.....  | 102        |
| 2.7.2.4  | Immobilisation des enzymes .....  | 104        |
| 2.7.3    | <i>Industries de panification : effet des laccases fongiques</i> .....  | 104        |
| 2.7.3.1  | Sur la qualité des pâtes .....  | 104        |
| 2.7.3.2  | Sur les propriétés rhéologiques .....   | 104        |
| 2.7.3.3  | Sur les structures macromoléculaires .....  | 106        |
| <b>3</b> | <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>  | <b>112</b> |
| 3.1      | MATERIEL .....  | 114        |
| 3.1.1    | <i>Farines</i> .....  | 114        |
| 3.1.2    | <i>Produits et réactifs utilisés</i> .....  | 118        |
| 3.1.3    | <i>Enzymes et additifs de panification</i> .....  | 118        |
| 3.1.3.1  | Laccases fongiques.....   | 118        |
| 3.1.3.2  | Glucose oxydase.....  | 120        |
| 3.1.4    | <i>Description du sitoxygraphe</i> .....  | 120        |
| 3.1.5    | <i>Description du bioréacteur</i> .....   | 124        |
| 3.2      | METHODES .....  | 128        |
| 3.2.1    | <i>Préparation des pâtes</i> .....  | 128        |
| 3.2.1.1  | Au sitoxygraphe .....   | 128        |
| 3.2.1.2  | Au bioréacteur .....  | 128        |
| 3.2.1.3  | Congélation des pâtes.....  | 130        |
| 3.2.2    | <i>Dosages biochimiques (farine et pâtes)</i> .....   | 130        |
| 3.2.2.1  | Activités enzymatiques extractibles .....   | 130        |
| 3.2.2.2  | Etat d'agrégation des protéines .....   | 134        |
| 3.2.2.3  | Dosages des lipides .....   | 136        |
| 3.2.3    | <i>Caractérisation des extraits de laccase</i> .....  | 142        |
| 3.2.3.1  | Dosage de l'activité laccasique à pH = 4 et pH = 5,6 .....  | 142        |
| 3.2.3.2  | Purification .....  | 144        |
| 3.2.3.3  | Dosages des protéines .....   | 146        |
| 3.2.4    | <i>Mesure de l'oxydation des phénols en milieu modèle par la laccase PC</i> .....   | 148        |
| 3.2.5    | <i>Analyse de données et méthode des plans d'expériences</i> .....  | 148        |
| 3.2.5.1  | Obtention des valeurs centrées réduites .....   | 150        |
| 3.2.5.2  | Choix du critère d'optimalité et établissement de la matrice d'expériences  | 150        |
| <b>4</b> | <b>RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>   | <b>154</b> |
| 4.1      | MISE AU POINT DU SITOXYGRAPHE.....  | 156        |
| 4.1.1    | <i>Quantification des échanges gazeux entre la pâte et l'atmosphère du pétrin : mesure de la consommation d'oxygène d'une pâte boulangère</i> ..... | 158        |
| 4.1.1.1  | Étanchéité du système « pétrin - dispositif de mesure des gaz » .....   | 158        |
| 4.1.1.2  | Détermination du volume du système.....   | 162        |



|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.1.2   | <i>Inertie de la réponse sur les mesures de gaz</i> .....   | 166 |
| 4.1.2.1 | Du système à vide .....   | 166 |
| 4.1.2.2 | Du système en charge.....   | 168 |
| 4.1.3   | <i>Influence de la pression sur la réponse du capteur de mesure d'oxygène</i> .....   | 176 |
| 4.1.3.1 | Description du phénomène.....   | 178 |
| 4.1.3.2 | Mise en évidence d'une surpression dans l'enceinte étanche lors de la 1 <sup>ère</sup> min de pétrissage .....                                      | 180 |
| 4.1.3.3 | Evolution de la pression pendant le pétrissage.....   | 182 |
| 4.1.3.4 | Etalonnage de la réponse du capteur à O <sub>2</sub> en fonction de la pression dans la cuve du sitoxygraphe.....                                   | 184 |
| 4.1.4   | <i>Représentation de la consommation d'O<sub>2</sub> et de la production de CO<sub>2</sub> d'une pâte de farine de blé tendre non levurée</i> ..... | 186 |
| 4.1.5   | <i>Modélisation des courbes de consommation d'O<sub>2</sub></i> .....   | 200 |
| 4.1.6   | <i>Mesure de couple</i> .....   | 204 |
| 4.2     | ETUDE D'UNE PATE TEMOIN PETRIE AU SITOXYGRAPHE .....  | 210 |
| 4.2.1   | <i>Répétabilité de la mesure de consommation d'oxygène de la pâte témoin</i> ....   | 210 |
| 4.2.2   | <i>Répétabilité de la mesure de pression</i> .....  | 210 |
| 4.2.3   | <i>Répétabilité de la mesure de couple</i> .....  | 212 |
| 4.2.4   | <i>Maturation de la farine témoin</i> .....   | 212 |
| 4.2.5   | <i>Optimisation des conditions de pétrissage</i> .....  | 214 |
| 4.2.5.1 | Avis de l'homme de l'art.....   | 214 |
| 4.2.5.2 | Etude de quelques paramètres de pétrissage .....  | 214 |
| 4.3     | ETUDE DU COMPORTEMENT DES FARINES AU COURS DU PETRISSAGE .....  | 226 |
| 4.3.1   | <i>Etude variétale 2005</i> .....   | 228 |
| 4.3.1.1 | Courbes de consommation et de vitesses instantanées de consommation d'oxygène .....   | 228 |
| 4.3.1.2 | Mesures biochimiques.....   | 248 |
| 4.3.1.3 | Paramètres de couple issus du sitoxygraphe .....  | 266 |
| 4.3.2   | <i>Etude variétale 2002 et 2003 (annexe 5)</i> .....  | 280 |
| 4.4     | EFFETS DE L'ADDITION D'AMELIORANTS CONNUS SUR LES DIFFERENTES PARAMETRES MESURES AU SITOXYGRAPHE.....   | 282 |
| 4.4.1   | <i>Influence de l'ajout de composés redox sur les propriétés des pâtes</i> .....  | 282 |
| 4.4.1.1 | Ajout d'acide ascorbique.....   | 282 |
| 4.4.1.2 | Ajout de L-cystéine .....   | 290 |
| 4.4.1.3 | Ajout d'oxydants chimiques (bromate, ADA).....  | 292 |
| 4.4.1.4 | Ajout de l' ABTS .....  | 300 |
| 4.4.2   | <i>Effet d'oxydoréductases sur les paramètres mesurés au sitoxygraphe</i> .....   | 302 |
| 4.4.2.1 | Effet de la glucose oxydase.....  | 302 |
| 4.5     | LA LACCASE : UNE ENZYME POTENTIELLEMENT INTERESSANTE EN PANIFICATION..  | 312 |
| 4.5.1   | <i>Etude préliminaire : sélection de deux laccases potentiellement intéressantes en panification (milieu modèle)</i> .....                          | 312 |
| 4.5.1.1 | Détermination des constantes cinétiques en milieu modèle.....   | 312 |
| 4.5.1.2 | Effet du NaCl 0,2 M sur l'activité laccasique .....   | 318 |
| 4.5.1.3 | Effet de l'ajout de laccase sur la consommation d'O <sub>2</sub> d'une base farine (BF14) au bioréacteur.....                                       | 320 |
| 4.5.2   | <i>Purification de la laccase de Pycnoporus cinnabarinus</i> .....  | 324 |
| 4.5.2.1 | Purification en deux étapes .....   | 324 |
| 4.5.2.2 | Caractéristiques physico-chimiques de la laccase purifiée .....   | 326 |
| 4.5.3   | <i>Inhibition de l'activité laccasique par les ions Cl<sup>-</sup></i> .....  | 328 |
| 4.5.4   | <i>Oxydation de mélanges de phénols en milieu modèle</i> .....  | 332 |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.5.4.1  | Mélanges AF-AS (pH 4 à 30 °C) .....   | 334        |
| 4.5.4.2  | Mélanges AF-DOPA (pH 5,6 à 30 °C) .....   | 342        |
| 4.5.4.3  | Mélanges AS-DOPA (pH 5,6 à 30 °C) .....   | 346        |
| 4.5.4.4  | Mélanges tyrosine-AF (pH 5,6 à 30 °C) .....   | 348        |
| 4.5.4.5  | Mélanges AF-ABTS et Tyrosine-ABTS (pH 5,6 à 30 °C) .....                            | 350        |
| 4.5.5    | <i>Effet de la laccase en milieu pâteux</i> .....                                   | 352        |
| 4.5.5.1  | Sur le volume du pain.....  | 352        |
| 4.5.5.2  | Sur la consommation d'oxygène.....  | 354        |
| 4.5.5.3  | Sur les mesures rhéologiques .....  | 356        |
| 4.5.5.4  | Effet des laccases en présence de médiateur d'oxydation au cours du pétrissage..... | 358        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>  | <b>370</b> |
| <b>6</b> | <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>392</b> |
| <b>7</b> | <b>ANNEXES.....</b>   | <b>I</b>   |
| 7.1      | ANNEXE 1 : .....  | II         |
| 7.2      | ANNEXE 2 : .....  | III        |
| 7.3      | ANNEXE 3 : .....  | IV         |
| 7.4      | ANNEXE 4 : .....  | V          |
| 7.5      | ANNEXE 5 : .....  | VI         |

---

## Liste des abréviations

- ABTS** : acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)  
**AF** : acide férulique ; **AS** : acide sinapique ; **AV** : acide vanillique ; **ApC** : acide *para*-coumarique ;  
**ASR** : acide syringique  
**AGL** : acide gras libre  
**AP** : Apache, **AU** : Aubusson, **BPMF** : base farine pour la meunerie française, **CA** : Cap Horn,  
**CH** : Charger, **CN04** : Corde Noire 2004, **CNS** : Corde Noire Spéciale, **ME** : Mendel, **NI** : Nirvana,  
**OR** : Orvantis, **QB** : Quebon, **S1** : Sankara n<sup>o</sup>1, **S2** : Sankara n<sup>o</sup>2  
**AX** : arabinoxylanes  
**BCA** : bicinchoninic acid, acide bicinchoninique  
**CAT** : activité catalasique extractible d'une farine ou d'une pâte exprimée en  $\mu\text{kat.g}^{-1}$  ms c'est-à-dire en  $\mu\text{moles d'O}_2$  produit par gramme de matière sèche  
**CO<sub>2</sub>Bt** : pourcentage de CO<sub>2</sub> basse teneur mesuré dans le cas de pétrissage de pâtes sans levure (gamme d'échelle comprise entre 0 et 1 %)  
**CO<sub>2</sub>Ht** : pourcentage de CO<sub>2</sub> haute teneur mesuré dans le cas de pétrissage de pâtes avec levure (gamme d'échelle comprise entre 0 et 50 % dans le cas du sitoxygraphe et comprise entre 0 et 100 % dans le cas du bioréacteur)  
**CV** : coefficient de variation (%) correspond au rapport de l'écart type sur la moyenne exprimé en pourcentage  
**DAG<sub>1,2</sub>**, **DAG<sub>1,3</sub>** : diacylglycérol, acide gras estérifié en position 1 et 2, et 1,3 respectivement  
**GOX** : activité glucose oxydasique ajoutée lors du pétrissage exprimée en  $\text{nkat.g}^{-1}$  ms c'est-à-dire en  $\text{nmoles d'O}_2$  consommé AF consommé par gramme de matière sèche  
**kat** : katal, le katal représente l'activité d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat et correspond à un nombre de mole de substrat consommé par seconde. Dans nos conditions, l'activité enzymatique est généralement exprimée en micro- ou nanokatals ramenés soit à la matière sèche de farine (en g) ou au volume d'extrait enzymatique (en mL)  
**LAC** : activité laccasique d'un extrait exprimée en  $\text{nkat.mL}^{-1}$  ou en  $\text{nkat.g}^{-1}$  ms. (détail de mesures, voir chapitre matériel et méthodes)  
**LBIAA** : Laboratoire de Biochimie Industrielle et Agroalimentaire  
**LOX** : activité lipoxygénasique extractible d'une farine ou d'une pâte exprimée en  $\text{nkat.g}^{-1}$  ms c'est-à-dire en  $\text{nmoles d'O}_2$  consommé par gramme de matière sèche  
**LPT** : lipides polaires totaux  
**MAG** : monoacylglycérol  
**mbar** : millibar  
**O<sub>2</sub>TOTAL** : quantité cumulée d'O<sub>2</sub> consommé en fin de pétrissage (à t = 60 minutes pour le bioréacteur et à t = 25 minutes pour le sitoxygraphe). Exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms  
**PMMA** : polyméthacrylate de méthyle  
**POD** : activité peroxydasique extractible d'une farine ou d'une pâte exprimée en  $\mu\text{kat.g}^{-1}$  ms c'est-à-dire en  $\mu\text{moles d'AF}$  consommé par gramme de matière sèche  
**PO<sub>2</sub>** : pression partielle en oxygène  
**PUFA** : (*polyunsaturated fatty acids*) acides gras polyinsaturés  
**R** : constante des gaz Parfaits =  $8,3145 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$   
**rpm** : rotation par minute  
**SG-FPM** : sous unité gluténique de faible poids moléculaire  
**SG-HPM** : sous unité gluténique de haut poids moléculaire  
**SMUFA** : (*saturated and monounsaturated fatty acids*) acides gras saturés et monoinsaturés  
**TAG** : triacylglycérol  
**Tyr** : tyrosine  
**V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>** : vitesse d'O<sub>2</sub> consommé à l'instant t de pétrissage au bioréacteur (V<sub>i</sub>O<sub>2B</sub>) ou au sitoxygraphe (V<sub>i</sub>O<sub>2S</sub>). Exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms. min}^{-1}$   
**V<sub>g</sub>** : volume de gaz au sein de la cuve du sitoxygraphe exprimé en L  
**V<sub>PP</sub>** : volume de pièce plastique utilisé pour réduire le volume de gaz au sein de la cuve pendant le pétrissage exprimé en L.  
**WACF** : (*Water absorption capacity*), hydratation nécessaire pour atteindre 500 UB (unités Brabender, unités arbitraires) lors du test au farinographe  
**WEAX** : (pour *Water Extractable ArabinoXylan*) arabinoxylanes hydrosolubles  
**WUAX** : (pour *Water Unextractable ArabinoXylan*) arabinoxylanes insolubles
-

# 1 INTRODUCTION



La fabrication du pain résulte de la mise en œuvre de farine, d'eau, de levure, de sel et, de nos jours, dans la plupart des cas, d'améliorants. Le pain autrefois élément de base de l'alimentation est devenu une denrée qui doit satisfaire le consommateur. Dans un contexte industriel de concurrence et de rentabilité élevées, la maîtrise du procédé de panification est cruciale. Or, la qualité de la matière première est variable puisque qu'elle dépend de nombreux facteurs différents d'une campagne à l'autre (origine variétale, technique agronomique, conditions climatiques). Ainsi, pour assurer la régularité des produits finaux, les industriels ont généralisé l'utilisation d'améliorants en panification. Une deuxième raison pour justifier de l'ajout d'améliorants dans les produits de panification peut être liée à la recherche de farines avec des fonctionnalités particulières. Une troisième est que l'utilisation des améliorants est un marché lucratif pour le producteur. Enfin une quatrième raison est la recherche perpétuelle de produits innovants, les plus rentables possibles (gain de temps et valeur ajoutée). Dans ce contexte, la caractérisation du comportement des farines pendant les étapes de panification, notamment dès le pétrissage est importante, d'une part, pour comprendre les mécanismes physiques et biochimiques intervenant dans l'élaboration de la pâte, d'autre part, prédire le comportement de cette dernière dans la suite du procédé de panification.

La pâte boulangère est un matériau viscoélastique complexe dans lequel interagissent de nombreuses molécules et coexistent de nombreuses réactions biochimiques. Parmi celles-ci, les réactions d'oxydoréduction jouent un rôle important (Nicolas, 1979). Les conditions d'hydratation et le travail mécanique apporté lors du pétrissage influencent les réactions et interactions au sein de la pâte pour lui conférer des propriétés rhéologiques uniques. Les qualités des pâtes sont évaluées manuellement par le boulanger en sortie de pétrin, « l'oxygénation » de la pâte est également appréciée de manière visuelle. En amont, du grain de blé à la farine, de nombreuses méthodes existent pour évaluer les propriétés biochimiques de farines et le comportement rhéologique des pâtes (Godon et Loisel, 1997), conditionnant la réussite du produit final, mais aussi permettant d'apprécier l'effet d'un améliorant sur le produit final.

Les améliorants sont des additifs, des adjuvants ou des auxiliaires technologiques (enzymes). Les enzymes présentent un intérêt grandissant car, d'une part, elles sont dénaturées lors de l'étape de cuisson (ne nécessitent pas d'étiquetage), et d'autre part, elles ont un mode d'action spécifique. Parmi celles-ci, les laccases sont des oxydoréductases potentiellement intéressantes.



Le but de ce travail de thèse est l'instrumentation et l'utilisation d'un pétrin pilote, le sitoxygraphe, pour quantifier les échanges gazeux entre la pâte et l'atmosphère pendant le pétrissage (consommation d'oxygène, production de dioxyde de carbone), mais aussi de mesurer l'évolution des caractéristiques rhéologiques des pâtes (mesure du couple sur le bras moteur). Ce travail s'inscrit dans le prolongement de travaux réalisés à la Chaire de Biochimie Industrielle et Agroalimentaire, portant sur l'étude des mécanismes de réactions d'oxydoréduction en milieu pâteux dans un pétrin de laboratoire instrumenté, le bioréacteur (Ameille, 1998 ; Celhay, 2000 ; Eyoum, 2002). Cinq questions ont été posées :

- Quels sont les acteurs de la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte de farine de blé tendre ne contenant pas de levure ? quand et comment agissent-ils dans un milieu complexe?

- Quels sont les facteurs limitant/favorisant la consommation d'O<sub>2</sub> (les conditions de pétrissage, l'O<sub>2</sub>, les enzymes, les substrats, la compétition d'une enzyme avec une autre pour l'O<sub>2</sub>, etc.) ?

- Quel est l'impact des réactions d'oxydation au sein de la pâte sur les composés biochimiques (enzymes, substrats, agrégation des protéines) et sur les caractéristiques rhéologiques et technologiques de la pâte ? Quel est l'effet de la formulation des farines (origine variétale, ajout d'améliorant) ?

- Que représente la mesure de couple s'exerçant sur le bras moteur d'une pâte pétrie au sitoxygraphe ? Quelles informations technologiques peut-on extraire de celle-ci ?

- Dans quelle mesure les phénomènes oxydatifs contribuent-ils aux modifications des propriétés rhéologiques acquises pendant le pétrissage ? Est-il possible de mettre en évidence des conséquences rhéologiques et technologiques provoquées par les phénomènes oxydatifs mesurés ? En d'autres termes peut-on relier les phénomènes oxydatifs au comportement technologique d'une farine et peut-on prédire ce comportement dès le pétrissage avec le sitoxygraphe.

Pour y répondre, la première partie a été consacrée à la mise au point du sitoxygraphe, passage d'une échelle expérimentale (600 g de pâte pétrie au bioréacteur) à une échelle pilote (3 kg de pâte dans le sitoxygraphe). L'apparition de nouveaux phénomènes à prendre en compte liés au changement d'échelle a nécessité des adaptations de l'instrumentation, leurs validations, ainsi que la mise en place d'une analyse systématique des données d'oxygène et la définition de paramètres d'analyse des données de couple. Pour valider la mise au point, l'effet de la formulation de la pâte sur les paramètres mesurés (effet de la composition des farines, mise en évidence des effets d'améliorants couramment utilisés) a été étudié. Cette





partie a également permis la comparaison des résultats obtenus avec le sitoxygraphe à ceux obtenus avec le bioréacteur. Dans une seconde partie, un volet plus appliqué vise à étudier l'action des laccases, des enzymes de la famille des oxydoréductases, dans la pâte lors du pétrissage. La caractérisation biochimique d'un lot de laccases a été réalisée, dans un premier temps en milieu modèle pour sélectionner deux enzymes les plus prometteuses, puis dans un second temps, l'effet de l'ajout de laccase, éventuellement en présence d'un médiateur d'oxydation a été étudié pendant le pétrissage au moyen du sitoxygraphe.



## 2 TRAVAUX ANTERIEURS



## **2.1 Généralités : place du pétrissage dans la panification**

En tant que première étape de la fabrication du pain, l'importance du pétrissage est cruciale pour la qualité du produit fini. En effet, pendant celui-ci, un ensemble de transformations (biochimiques et physiques) complexes ont lieu. Indispensable pour le passage de la farine à la pâte, le pétrissage permet surtout d'obtenir une pâte macroscopiquement homogène et lisse dotée de propriétés viscoélastiques déterminantes dans l'élaboration du pain. Bien que composée simplement de farine et d'eau en grande partie, la pâte pétrie est un enchevêtrement structuré de molécules réparties dans trois phases, liquide, solide et gazeuse, que l'on peut séparer en fractions hydrosolubles, insolubles dans l'eau (amidon, gluten, pentosanes principalement) et contenant des molécules de gaz.

Le pétrissage peut être décomposé en plusieurs étapes (associées à plusieurs fonctions). La première est la formation de la pâte, l'état physique du mélange évolue d'un état particulaire (milieu discontinu) à une pâte cohésive. En général, cette première phase est appelée le frasage, son but est l'homogénéisation des quatre composants de la pâte. L'eau assure la plastification du système (Potus *et al.*, 1992), favorisant la mobilité moléculaire permettant notamment aux enzymes d'agir, mais aussi la migration des lipides aux interfaces gaz-pâte. Cette étape est marquée par une augmentation rapide de la température du milieu, la chaleur dégagée est appelée chaleur d'imbibition.

La seconde étape débute par le passage à une vitesse de brassage plus élevée. Le pétrissage n'a plus seulement la fonction de mélange. En effet, le travail mécanique est plus intense (apport d'énergie) et a des conséquences physiques et biochimiques liées. Tout d'abord, le mélange constant des différents ingrédients de la pâte répartit les levures au sein de celle-ci.

Par ailleurs, la dispersion concerne également l'ensemble des molécules contenues dans la farine et accroît leurs probabilités de rencontre favorisant ou modifiant les interactions entre elles : enzymes-substrat, protéines-lipides, protéines-pentosanes, protéines-amidon, protéines-protéines, etc. Les interactions moléculaires au sein de la pâte peuvent être de faibles énergies (hydrophobes, liaisons hydrogène) ou engendrer des réactions chimiques (formation/coupage de liaisons covalentes), ces dernières étant le plus souvent catalysées par des enzymes.

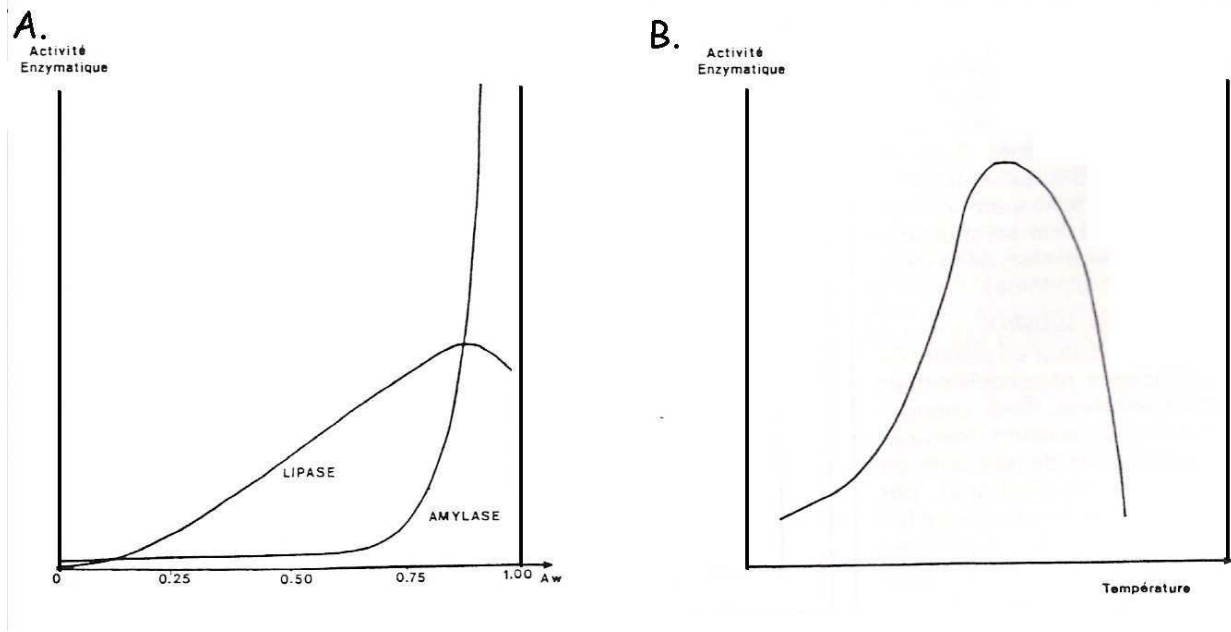


Figure 1 Effet de l'activité de l'eau et de la température sur les activités enzymatiques (d'après Potus, 1997).

Parmi les réactions enzymatiques, les réactions d'oxydoréduction et les réactions d'hydrolyse de l'amidon sont les plus importantes au cours du pétrissage (Grosch, 1986 ; Grosch et Wieser, 1999). En milieu pâteux, l'action des enzymes est également favorisée, car l'Aw de la pâte est proche de 1 (accélération des réactions biochimiques) et la température augmente sensiblement (favorisant aussi l'activité enzymatique) (figure 1). Enfin, le brassage de la pâte permet l'incorporation de microbulles d'air, qui constituent un apport d'oxygène aux systèmes enzymatiques d'oxydoréduction, mais aussi forment les *nuclei* gazeux, futurs alvéoles de la mie de pain (Baker et Mize, 1946).

Par ailleurs, les contraintes mécaniques exercées (étirement, compression, cisaillement) vont participer à l'acquisition des propriétés viscoélastiques de la pâte avec la formation d'un réseau suffisamment extensible pour permettre aux alvéoles gazeux de se former lors de la fermentation et suffisamment élastique pour que ces alvéoles résistent sans rompre à la pression du CO<sub>2</sub> produit. Ces contraintes varient selon les pétrins utilisés (forme, taille, géométrie de la cuve et des bras, vitesse du (ou des) bras et incorporation d'énergie cinématique dans la pâte).

L'optimum de pétrissage correspond au temps auquel la consistance de la pâte est maximale. Ce temps n'est pas nécessairement le moment où la pâte possède les meilleures propriétés rhéologiques, assurant la meilleure qualité du produit fini possible. En revanche, au-delà d'une certaine durée de pétrissage, la pâte s'affaiblit, s'effondre et devient collante : la pâte est surpétrée (« dough breakdown » dans la terminologie anglosaxonne). Selon les pétrins utilisés, selon les qualités de farines, selon les fonctionnalités désirées, la formulation est adaptée aux propriétés désirées. Ce terme désigne les proportions des différents ingrédients (nature et quantité) pouvant composer la pâte : composition des farines, teneur en eau de la pâte, présence de sel, flore fermentaire (levure *Saccharomyces cerevisiae*, poolish, levain, starter), améliorants (additifs et auxiliaires technologiques).

Actuellement, les industriels de la panification agissent à tous les niveaux du procédé pour atteindre un produit final de plus en plus technique (valeur ajoutée), de qualité, à moindre coût et dans un temps le plus court possible. A ce titre, ils élaborent des formules contenant des améliorants fonctionnels, dont l'image a un impact au niveau du consommateur (apport nutritionnel, santé). La mise au point de nouveaux améliorants s'inscrit dans cette démarche.

Le cadre de ce projet de thèse s'inscrit pleinement dans ce contexte, son but est la mise au point d'un outil de caractérisation de la pâte directement au cours du pétrissage par des



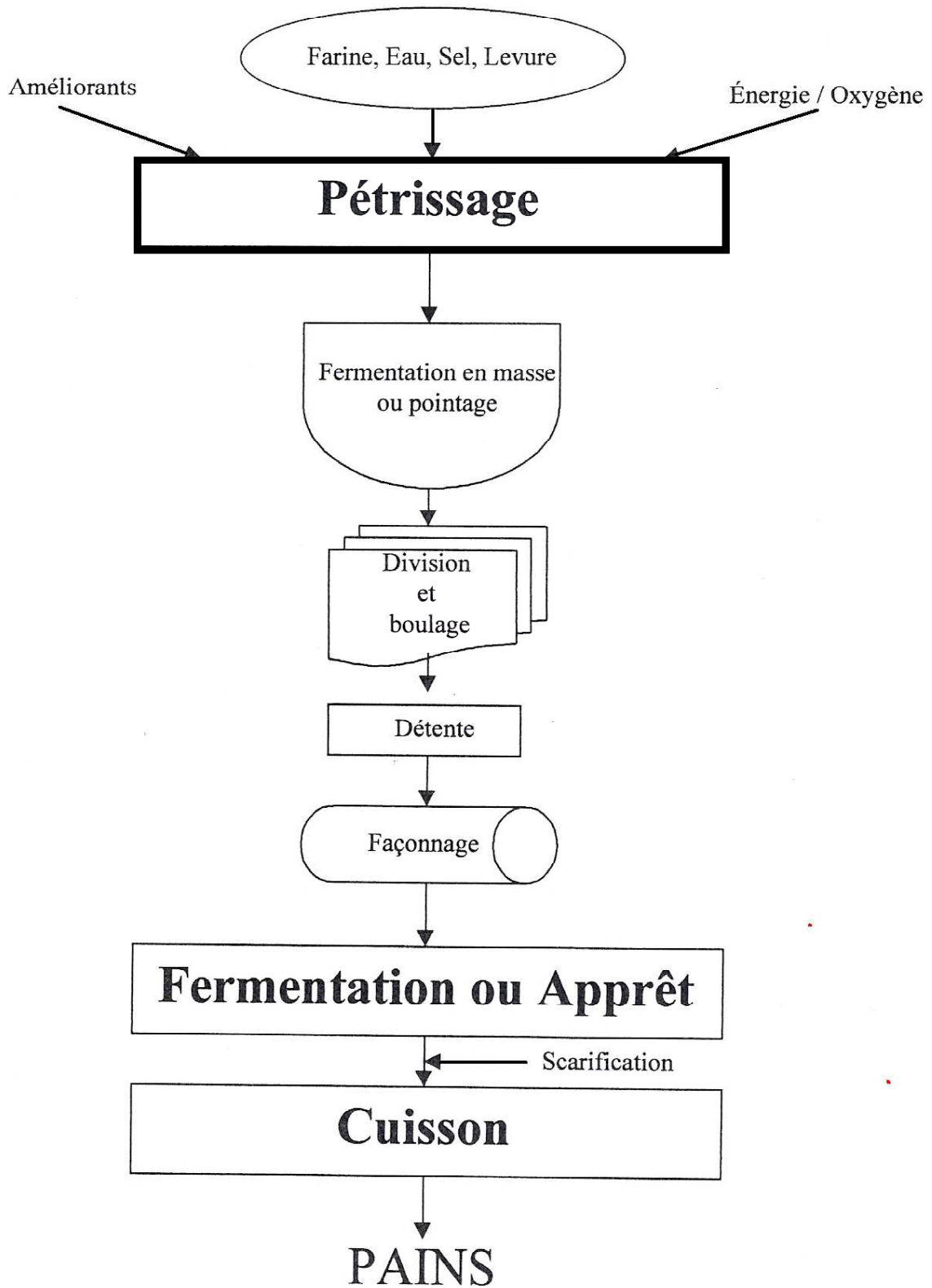


Figure 2. Etapes générales de la panification.

données relatives à la biochimie des pâtes (consommation d'O<sub>2</sub>) et à leurs propriétés rhéologiques (mesure de couple). Un tel outil réalise par ailleurs un pétrissage, à une échelle pilote qui permet d'une part, de travailler la pâte dans des conditions proches de celles du boulanger et d'autre part, une caractérisation rhéologique et biochimique par analyse d'échantillons de pâte.

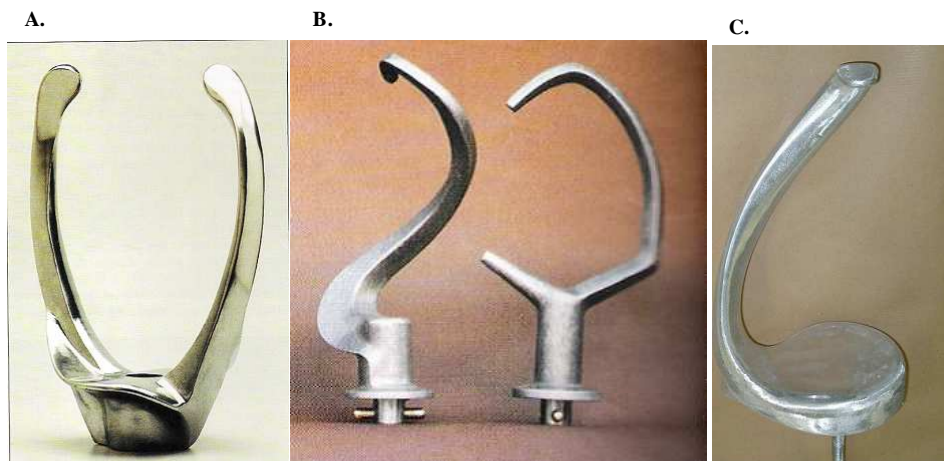
### 2.1.1 Etapes générales de la panification

Classiquement, le procédé de panification est divisé en phases de travail et de repos de la pâte (figure 2) :

- Le but du **pétrissage** (première phase active) est de former un milieu macroscopiquement homogène, structuré et capable de se déformer sans rompre lors de l'expansion des alvéoles gazeux (fermentation). Le critère de stabilité du réseau formé est aussi important pour éviter la perte de ces qualités.
- **Le pointage** (phase de repos en cuve) est une étape de fermentation en masse. Il correspond à la fermentation alcoolique des sucres avec une production de CO<sub>2</sub>. Ce dégagement gazeux provoque le développement des *nuclei* gazeux formés lors du pétrissage en alvéoles retenant le CO<sub>2</sub> produit. Lors du pointage une structuration lente de la pâte s'opère également permettant de consolider le réseau de gluten et stabiliser les interfaces gaz-pâte, ainsi que libérer des sucres fermentescibles.
- **Le pesage** est une phase de division puis boulage des pâtons. La manipulation de ceux-ci peut avoir un effet néfaste sur les propriétés rhéologiques de la pâte.
- **La détente** est une étape de repos qui dure environ 20 min.
- **Le façonnage** est l'étape de mise en forme des pâtons. Cette étape est également préparatrice à l'apprêt. En effet, les contraintes appliquées lors de la mise en forme des pâtons vont agir sur les bulles de gaz, réduire leur taille en augmentant leur nombre.
- **L'apprêt** constitue la seconde étape de fermentation de la pâte. Le gain de volume provoqué par l'expansion de petits alvéoles gazeux au cours de cette étape est important. Si le nombre d'alvéoles initial est important, le nombre des bulles de gaz le sera également.
- **La cuisson** est l'étape qui fige la structure du pain. Elle se déroule dans une atmosphère saturée en eau. La température dans le four se situe entre 200 et 300 °C et le temps de cuisson est compris entre 20 et 30 min. Les alvéoles du pâton levé se dilatent. Dans

**Tableau 1. Durée des petite (40 rpm) et grande (80 rpm) vitesses utilisées selon le type de pétrissage (d'après Feillet, 2000)**

| Type de pétrissage | Durée de la petite vitesse | Durée à grande vitesse |
|--------------------|----------------------------|------------------------|
| conventionnel      | 15 min                     | absent                 |
| amélioré           | 3 à 5 min                  | 12 min                 |
| intensifié         | 3-5 min                    | 18-20 min              |



**Figure 3. Exemple de forme de bras de pétrin oblique (A.), spirale (B.) et horizontal (sitoxygraphe, C.). Echelle relative non respectée pour les dimensions des bras.**

le même temps, l'amidon est gélatinisé, le gluten se coagule et la croûte est formée (réaction de Maillard). Pendant cette étape, des arômes sont produits

- **Le ressuage** est une étape finale qui permet le dégagement de CO<sub>2</sub> et de vapeur d'eau.

### 2.1.2 Procédés de pétrissage et types de pétrins utilisés

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, le pétrissage était manuel effectué en plusieurs étapes séparées par des temps de repos. Puis, l'intensification du pétrissage a profondément modifié le métier du boulanger. En France au début des années 80, trois types de pétrissage existent : le pétrissage conventionnel, le pétrissage intensif et le pétrissage amélioré. Le tableau 1 présente les caractéristiques de chaque procédé (Feillet, 2000). D'après Feillet (2000), le pétrissage conventionnel assure un apport d'énergie mécanique insuffisant quand le gluten des farines est tenace. Le pétrissage amélioré assure un bon équilibre entre développement de la pâte, conservation de sa texture, goût et arôme mais au détriment du volume final du pain. Enfin, le pétrissage intensifié donne un pain volumineux et blanc, mais insipide.

En France, l'utilisation de pétrins discontinus est généralisée dans l'artisanat. La plupart des pétrins ont été mis au point dans les années 50. Depuis, ils ont été constamment améliorés. Les pétrins actuels présentent une diversité importante de forme, de cuve (motorisée ou non), de bras (simple ou double, mobile ou non), d'énergie apportée à la pâte et de la vitesse des bras. Les améliorations apportées sont difficilement dissociables des applications désirées. Quatre types de pétrins sont plus particulièrement utilisés, les pétrins à axe oblique, les pétrins spirales, les pétrins à bras plongeants et les pétrins horizontaux. Des exemples de formes de bras sont présentés (figure 3). Une comparaison des différents pétrins est fournie dans les tableaux 2 et 3. Par rapport aux pétrins artisanaux classiques, le sitoxygraphe, en dehors du fait qu'il s'agit d'un pétrin pilote, est utilisé avec des vitesses (V1 et V2) lentes. En revanche, l'énergie fournie à la pâte est importante (entre 40 et 90 kJ.kg<sup>-1</sup> pâte) probablement car la totalité de la masse de pâte est pétrie à chaque tour de bras). Par ailleurs, l'échauffement de la pâte est faible, ce résultat étant probablement dû à la régulation en température (20 °C) appliquée pendant le pétrissage dans la double enveloppe. Au niveau du travail de la pâte, ce type de pétrin réalise à la fois la compression et l'extension de la pâte avec une homogénéisation de la pâte très rapide

**Tableau 2. Comparaison des caractéristiques de fonctionnement des pétrins français les plus répandus (d'après Roussel et Chiron, 2002) avec les caractéristiques du sitoxygraphe.**

| Type de pétrin                  | Capacités (kg <sub>farine</sub> ) | Vitesse (rpm)                                | Energie fournie (kJ.kg <sup>-1</sup> pâte) | Echauffement des pâtes (°C.min <sup>-1</sup> ) | Cuve  |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|-------|
| Axe oblique                     | 30 à 200                          | V1 (4 min) : 35-50<br>V2 (12 min) : 70-80    | V1 : 3,75 à 5,25<br>V2 : 15,75 à 24,75     | V1 : 2,3 à 3,5<br>V2 : 3,5 à 5,5               | libre |
| Spirale                         | 16 à 200                          | V1 (2 min) : 100-110<br>V2 (8 min) : 200-220 | V1 : 1,5 à 3<br>V2 : 24 à 30               | < 1  | libre |
| Cycloïdal<br>Bras<br>plongeants |                                   | V1 (2-4 min) : 40-50<br>V2 (17-18 min) : 70  | 7,2 à 10,8                                 | V2 : 0,2 à 0,3                                 | libre |
| Horizontal<br>(sitoxygraphe)    | 1,5 – 5<br>kg                     | V1 (1-2 min) : 30<br>V2 (13 min) : 30-75     | V1 : 5 à 10<br>V2 : 42,5 à 90              | V2 : 0,1 à 0,3                                 | fixe  |

**Tableau 3. Comparaison des effets de différents pétrissage sur les pâtes avec ceux du sitoxygraphe**

| Type de pétrin              | Type de travail de la pâte | Incorporation d'air | Formation de la pâte | Caractéristiques des pâtes  |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|---|
| Axe oblique                 | extension                  |                     | lente                | Couleur blanche, pâte lisse (relâchement de la pâte pendant la rotation de la cuve)                       |
| Spirale                     | compression                | faible              | rapide               | Couleur crème, faible oxydation   |
| Bras plongeants (cycloïdal) | extension intense          | soufflage           | rapide               | Alvéolage irrégulier (grosses inclusions d'air)   |
| Horizontaux (sitoxygraphe)  | compression<br>extension   | fortes              | Très rapide          | Couleur crème, allure déchirée de la pâte au pétrissage, totalité de la pâte pétrie à chaque tour de bras |

(inférieure à 1 min). Enfin, 15 min sont nécessaires à l'obtention d'une pâte bien pétrie, de couleur crème et contenant de multiples microbulles de gaz (d'après le concepteur du pétrin).

Dans l'industrie, le pétrissage est effectué dans des pétrins continus, réalisant le mélange de la pâte instantanément. Aux Etats-Unis et en Angleterre, de pétrins spécifiques sont utilisés pour la fabrication industrielle de pain, dans des procédés caractérisés par un apport bref mais très intense d'énergie (pétrissage de moins de 10 minutes, vitesse de bras de plusieurs centaines de rpm (CBP, Chorleywood Bread process, Amflow<sup>®</sup>, Do-Maker<sup>®</sup>). En Angleterre, dans le procédé Chorleywood (CBP), l'apport d'énergie à la pâte est de l'ordre de 9 à 11 kJ.kg<sup>-1</sup> de pâte en un temps très court (moins de 3 min à des vitesses comprises entre 400 et 600 rpm). Des variantes de ces technologies industrielles utilisent des systèmes de dégazage et/ou de refroidissement (dû au fort échauffement des pâtes). Elles peuvent être menées dans des atmosphères confinées en surpression ou sous vide partiel (impact sur l'incorporation du gaz dans la pâte).

## 2.2 Estimation des caractéristiques viscoélastiques des pâtes de farine de blé

Le pétrissage est l'étape préparatrice de la structure de la pâte (mise en place des réseaux protéique et polysaccharidique). La rhéologie est la science qui étudie le type de déformation subie par les matériaux, leur mode d'écoulement ou leur rupture quand une force leur est appliquée (et inversement). Ces phénomènes déterminent les propriétés fonctionnelles des aliments. Dans le cas de la pâte de farine de blé tendre, ses caractéristiques viscoélastiques lui sont conférées principalement lors du pétrissage et lors des phases de repos. Elles s'expriment ensuite pendant les étapes de fermentation, manipulation de pâtons (stabilité), de cuisson et au moment de la consommation du pain (texture) (Cheftel *et al.*, 1977).

La pâte est constituée de nombreux composés ayant chacun leurs propriétés physiques propres et interagissant afin de conduire à un comportement rhéologique. Lorsqu'elle est soumise au pétrissage (contraintes mécaniques), les propriétés viscoélastiques de la pâte évoluent au cours du temps (Hoseney, 1994). Il en est de même au repos pendant les phases de fermentation.

| PATE                           |                       | INSUFFISANCE   |                          |   |       | EXCES |       |   |                          |                           |
|--------------------------------|-----------------------|--|--------------------------|---|-------|-------|-------|---|--------------------------|---------------------------|
|                                |                       | 1  | 4                        | 7 | 10    | 7     | 4     | 1 |                          |                           |
| <b>PETRISSAGE</b>              | Lissage               |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Collant de la pâte    |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Consistance           |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/> /25 |                           |
|                                | Extensibilité         |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Elasticité            |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>POINTAGE</b>                | Relâchement           |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Détente : relâchement |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/> /10 |                           |
| <b>FACONNAGE</b>               | Allongement           |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Dechirement           |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/> /25 |                           |
|                                | Elasticité            |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Collant de la pâte    |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>APPRET</b>                  | activité fermentaire  |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Pâte : déchirement    |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/> /10 |                           |
| <b>MISE AU FOUR</b>            | Collant de la pâte    |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Tenue de la pâte      |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/> /30 |                           |
| <b>NOTE PATE / 100</b>         |                       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/>     |                           |
| <b>PAIN</b>                    |                       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>ASPECT DU PAIN</b>          | Section               |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Couleur               |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Epaisseur             |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/> /70 |                           |
|                                | Croustillant          |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Coups de lame         | Jeté   |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       | Régularité   |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       | Déchirement  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>VOLUME</b>                  | poids1                |  | poids2                   |   | Vol 1 |       | Vol 2 |   | <input type="text"/> /30 |                           |
|                                | (en kilogramme)       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Volume moyen          |  | <input type="text"/> cm3 |   |       |       |       |   | <input type="text"/>     |                           |
| <b>MIE</b>                     |                       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>ASPECT DE LA MIE</b>        | Texture               | Couleur  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       | Souplesse  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       | Elasticité   |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Alvéolage             | Collant  |                          |   |       |       |       |   |                          | <input type="text"/> /100 |
|                                |                       | Régularité   |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       | Epaisseur  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                | Flaveur               |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>NOTE MIE / 100</b>          |                       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       |  |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/>     |                           |
| <b>VALEUR BOULANGERE / 300</b> |                       | = <input type="text"/> + <input type="text"/> + <input type="text"/> |                          |   |       |       |       |   | <input type="text"/>     |                           |
|                                |                       | PATE      PAIN      MIE      VBOU                                    |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
| <b>OBSERVATIONS</b>            | longueur des pâtons   |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |
|                                |                       |  |                          |   |       |       |       |   |                          |                           |

Figure 4 Grille de notation utilisée pour l'appréciation de la pâte dans le cadre de norme AFNOR (NF V 03-716).

| Critère           | Caractère apprécié de la pâte                                 |
|-------------------|---|
| Consistance (1)   | Caractéristiques viscoélastiques                              |
| Collant (2)       | Adhérence de la pâte au dos de la main                        |
| Extensibilité (3) | Capacité d'allongement jusqu'à rupture                        |
| Elasticité (4)    | Capacité à reprendre et vitesse de retour à la forme initiale |
| Relâchement       | Tenue de la pâte  |



Figure 5 Appréciation manuelle de la qualité d'une pâte lors du pétrissage



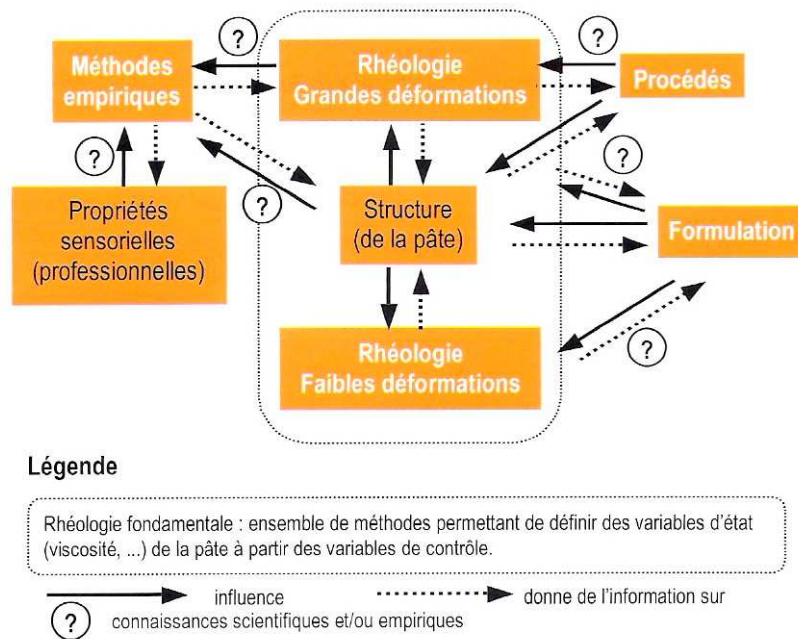


Figure 6. Etablissement de liens entre les différents méthodes d'analyse de la texture des pâtes (d'après Roussel *et al.*, 2006a).

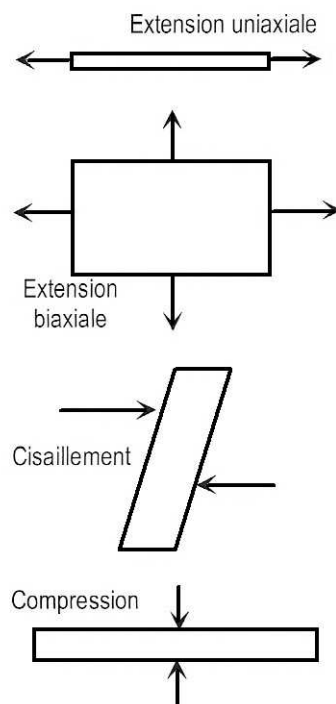


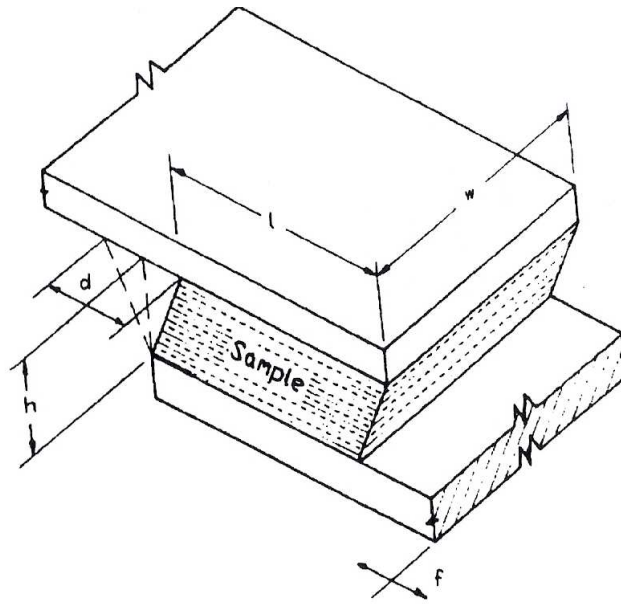
Figure 7. Les différents types de sollicitations mécaniques

### **2.2.1 Appréciation de la qualité des pâtes**

L'appréciation de la qualité d'une pâte par un boulanger artisanal est classiquement réalisée au toucher. En 1993, une approche complète a été développée, la méthode BIPEA, afin de normaliser le protocole d'appréciation des pâtes et des pains au cours du procédé (Faisy et Fischer, 2002). Le comportement de la pâte est noté, 10 correspondant à la note maximale, 1 correspondant à la note la plus faible (Insuffisance ou excès du phénomène décrit par le paramètre). Les différents critères d'évaluation sont donnés sur un exemple de fiche présenté dans la figure 4. Tout au long du processus de panification, la pâte, la mie et le pain dans son ensemble sont notés et la somme de ses trois notes caractérise la valeur boulangère du produit final (sur 300). Lors de la mise au point de cette méthode, un accent particulier a été mis sur la répétabilité et la fiabilité des évaluations pour un ensemble de laboratoire. Les critères d'estimation de la qualité des pâtes sont appréciés pendant ou après le pétrissage (consistance, collant, extensibilité, élasticité, relâchement, figure 5). Dans l'industrie, les caractéristiques dimensionnelles (volume, longueur du pain), les caractéristiques visuelles, les caractéristiques de texture et les qualités de conservations sont particulièrement importantes à maîtriser. Actuellement, en France, dans le cadre du projet AsCoPain, un recueil de connaissances est constitué afin d'harmoniser le langage des différents acteurs de la filière blé – farine - pain. Un des objectifs est de développer un système expert d'aide à la décision dans une approche déductive et prédictive des comportements qualitatifs de la pâte (Roussel *et al.*, 2006a). Pour cela, les acteurs du projet font l'inventaire des termes utilisés dans les différents niveaux (profane, métier et scientifique), les rendent explicites de façon à faire le lien entre les différents « langages » employés et les regroupent dans un glossaire terminologique (Roussel *et al.*, 2006b). Le lien entre les différentes approches d'analyse des propriétés de texture est présenté dans la figure 6 (Roussel *et al.*, 2006a).

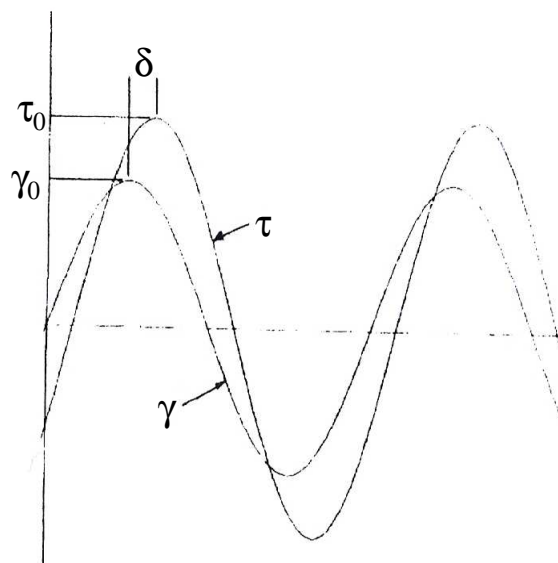
### **2.2.2 Outils de caractérisation rhéologique**

Un grand nombre d'appareils ont été mis au point pour caractériser les propriétés rhéologiques des pâtes aux petites (rhéologie dynamique ou oscillatoire) et aux grandes déformations. Les principales déformations appliquées à la pâte (extension biaxiale ou uniaxiale, cisaillement et compression) lors des tests rhéologiques sont présentées schématiquement sur la figure 7.



Montage des plaques parallèles pour test dynamique.  
 $d$  = déformation,  $f$  = force transmise à travers l'échantillon,  
 $h$  = hauteur de l'échantillon,  $l$  = longueur de l'échantillon,  
 $w$  = largeur de l'échantillon.

Figure 8. Représentation schématique d'un appareil de mesure de rhéologie dynamique



$\tau$  : Amplitude du mouvement sinusoïdal de la plaque supérieure  
 $\gamma$  : Mouvement transmis à la plaque inférieure par l'échantillon  
 $\delta$  : Décalage de phase

Figure 9. Courbe obtenue avec un rhéomètre dynamique

### 2.2.2.1 Rhéologie dynamique (faibles déformations)

Le principe général est la mesure de la contrainte («  $\tau$  »), lorsqu'une déformation est imposée à un échantillon de pâte et inversement. La figure 8 illustre ce principe. L'échantillon de pâte à analyser est placé entre deux plaques. Lorsque la plaque supérieure oscille, une déformation est appliquée à la pâte qui transmet à la plaque inférieure une partie de la force qui lui a été imposée («  $\gamma$  »). A partir des courbes de contraintes et de réponse, l'amplitude de mouvement sinusoïdal de la plaque supérieure, le mouvement transmis à la plaque inférieure ainsi que le décalage de phase («  $\delta$  ») sont déterminés (figure 9). Un échantillon totalement élastique provoque un phasage nul tandis qu'un échantillon visqueux donne une valeur de  $\delta$  égale à  $90^\circ$  (Hoseney, 1994 ; Berland et Launay, 1995).

Trois paramètres sont extraits des courbes de la figure 9 :

- $G'$  ou module conservatif, fait référence à la composante élastique des propriétés viscoélastique de la pâte

$$(I) \quad G' = \left( \frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \times \cos (\delta)$$

- $G''$  ou module dissipatif, représente l'énergie perdue par le système et fait référence à la composante visqueuse de la pâte

$$(II) \quad G'' = \left( \frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \times \sin (\delta)$$

- $\tan \delta$  ou rapport visco-élastique reflète l'importance relative du caractère élastique ou visqueux de la pâte.

$$(III) \quad \tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Quand  $\delta$  est égal à 0,  $G''$  est égal à 0, le milieu est élastique. Quand  $\delta$  est égal à  $\pi/2$ ,  $G'$  est égal à 0, le milieu est visqueux. Les contraintes appliquées à la pâte peuvent être biaxiales

Déformation (selon Hencky) :  $\epsilon_b = \frac{1}{2} \cdot \ln \frac{L_0}{L}$

Vitesse de déformation :  $\dot{\epsilon}_b = -\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{L} \cdot \frac{dL}{dt}$

Contrainte :  $\sigma = \frac{F}{S}$

Cas (a) : Entrefeer partiellement rempli <---> S variable

Si l'on suppose l'incompressibilité de la pâte, on a conservation du volume au cours de la déformation :  $V = \pi R_0^2 L_0 = \pi R^2 L$ , d'où :

$$\sigma_{(a)} = \frac{1}{\pi R_0^2} \cdot \frac{L}{L_0} \cdot F$$

Cas (b,c) : Plateau supérieur et échantillon de même diamètre <---> S constante

$$\sigma_{(b)} = \frac{1}{\pi R_0^2} \cdot F$$

- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| $L_0$ : hauteur initiale du disque de pâte      | $R_0$ : rayon initial du disque    |
| $L$ : hauteur à l'instant t                     | $R$ : rayon à l'instant t          |
| $-\frac{dL}{dt}$ : vitesse du plateau supérieur | $S$ : surface supérieure du disque |
| $F$ : force                                     | $V$ : volume du disque             |

Figure 10. Calcul des grandeurs rhéologiques en extension biaxiale par compression en conditions lubrifiées (CCL), d'après Bartolucci (1997).

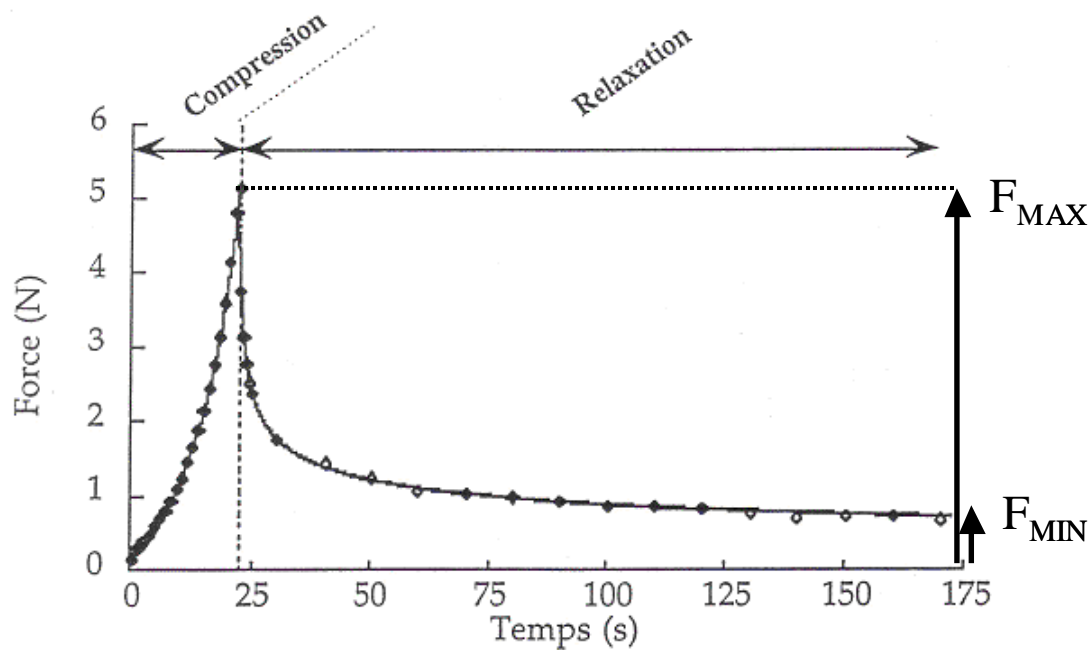


Figure 11. Courbe de compression relaxation obtenue au texturomètre (Bartolucci, 1997).

ou en cisaillement selon le type d'appareillage utilisé. Dans tous les cas, les résultats sont exprimés en unités standards communes à l'ensemble des outils de mesure.

### **2.2.2.2 Rhéologie aux grandes déformations**

Les tests de compression relaxation comportent une phase de compression (d'un cylindre de pâte entre deux plateaux) et une phase de relaxation. Ces tests permettent d'étudier le comportement rhéologique des pâtes aux grandes déformations.

#### **2.2.2.2.1 Compression uniaxiale lubrifiée**

Lors de la compression, la force exercée (solicitation) impose une extension biaxiale, entraînant augmentation de surface de l'échantillon de pâte. Pour limiter le cisaillement au niveau des extrémités fixes et les frictions, la compression se fait en conditions lubrifiées (Macosko, 1994). L'épaisseur ( $\delta$ ) et la viscosité ( $\eta_L$ ) de la couche de lubrifiant doivent se situer entre certaines limites pour que la déformation induite soit effectivement une extension biaxiale pendant toute la déformation : si le rapport  $\eta_L R^2 / \eta \delta^2$  est trop faible ( $< 2\delta/L$ ), le lubrifiant est rapidement expulsé ; s'il est trop élevé ( $> 20$ ), cela revient à ne pas mettre de lubrifiant et on provoque un cisaillement dans l'échantillon (Secor, 1988 ; Macosko, 1994).

La figure 10 regroupe les calculs des grandeurs rhéologiques en extension biaxiale par compression en conditions lubrifiées (Bartolucci, 1997).

#### **2.2.2.2.2 Relaxation et propriétés viscoélastiques**

La relaxation intervient lors du relâchement instantané des contraintes mises en place lors de la déformation d'un échantillon, sachant que celle-ci a été exercée jusqu'à une certaine amplitude puis maintenue à un niveau constant si possible à contrainte imposée.

Si la déformation est maintenue, un solide élastique ne présente aucune relaxation de contrainte, alors qu'un fluide visqueux parfait présente une relaxation immédiate. La relaxation commence dès l'application d'une déformation (Bartolucci, 1997). Pendant la phase de compression, la partie initiale rapide de la relaxation est masquée. En conséquence, la relaxation apparaît plus lente qu'elle ne l'est en réalité.



A partir des courbes de compression relaxation (figure 11), l'indice (ou degré) de relaxation IR est calculé d'après la formule suivante (IV) :

$$(IV) \quad IR = \frac{(F_{MAX} - F_{MIN})}{F_{MAX}}$$

Avec,

$F_{MAX}$  : force maximum atteinte en fin de compression (en N)

$F_{MIN}$  : force minimum atteinte à la fin de la relaxation (en N)

Une pâte visqueuse a un IR qui tend vers 1. Au contraire, une pâte élastique tend vers des valeurs de IR proches de 0.

Les propriétés rhéologiques de la pâte boulangère varient de façon non linéaire avec la vitesse et le taux de déformation. Du point de vue technologique, la caractérisation du comportement de la pâte est intéressant s'il se rapproche des conditions de déformations de la pâte lors du procédé. Dobraszczyk et Roberts (1994) montrent que lors de l'expansion des cellules gazeuses la déformation est de type extension biaxiale, le taux de déformation de la pâte est important (grande déformation) et les phénomènes se déroulent à faible vitesse. Selon Bartolucci et Launay (2000), les propriétés d'extension biaxiale sont très probablement impliquées dans le façonnage de la pâte et l'expansion des bulles de gaz pendant la cuisson. Dobraszczyk et Morgenstern (2003) confirment que la déformation subie par la pâte entourant les bulles de gaz pendant leur expansion se fait suivant une extension biaxiale. Selon Sliwinski *et al.* (2004a), ce ne serait pas le seul type de déformation rencontré lors du procédé de panification : la pâte serait également soumise à des extensions uniaxiales et à des cisaillements. Par exemple pendant le façonnage, la pâte est déformée avec une combinaison de cisaillement et d'élongation uniaxiale à des vitesses de déformation relativement élevées (Sliwinski *et al.*, 2004b), ce qui pourrait également remettre en cause le fait que la déformation se fasse à faible vitesse. Sliwinski *et al.* (2004b) notent que la plupart des données rhéologiques, publiés lors d'études précédentes, sont obtenues à des petites déformations et/ou à de grandes vitesses de relaxation. La mesure des propriétés rhéologiques de la pâte (rhéologie dynamique ou semi-empirique) nécessite une mise en forme préalable du pâton à analyser. Très récemment, Davidou *et al.* (2007) ont discuté de l'influence de la mise en forme sur les propriétés rhéologiques mesurées.





Figure 12. Photographie des fraseur du farinograph de brabender ®

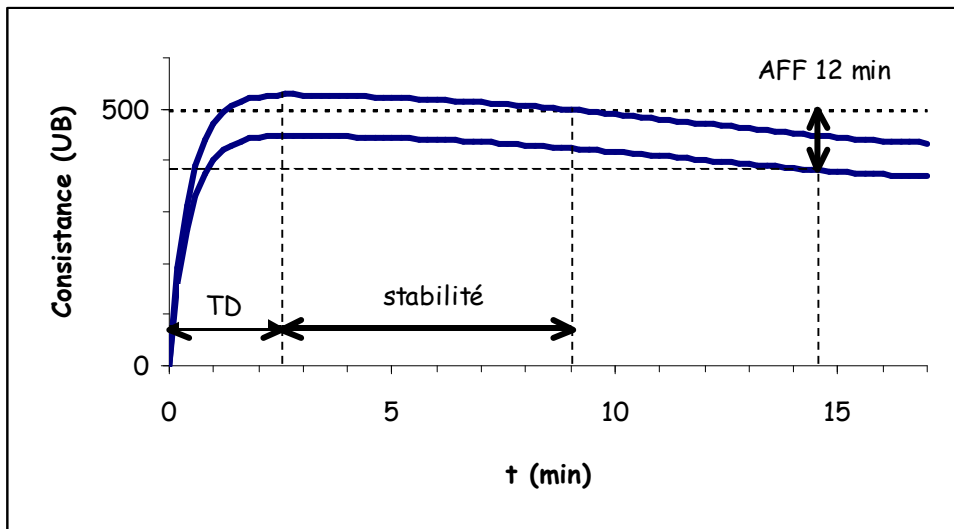


Figure 13. Exemple de farinogramme.

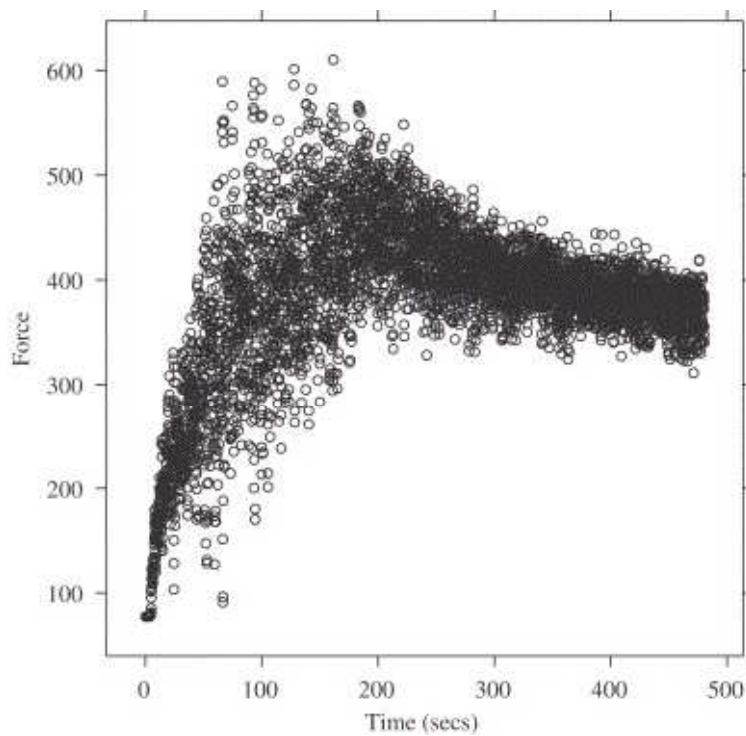


Figure 14. Exemple de courbe de couple obtenue avec le mixographe.

### **2.2.2.3 Instrumentation des pétrins pour la caractérisation des pâtes boulangères**

Pour tenter d'analyser les qualités boulangères des farines, les effets des formulations employées et l'impact des conditions de pétrissage sur les qualités rhéologiques des farines, de nombreux outils ont été développés, la plupart tentant de mimer les déformations subies par la pâte sans que celles-ci soient contrôlées lors des différentes étapes de panification. Parmi ceux-ci, les plus connus et répandus sont l'alvéographe<sup>®</sup> (inventé par M. Chopin en 1937) et l'extensographe<sup>®</sup>. Ces deux appareils étudient les déformations de la pâte sur des pâtons déjà mis en forme. Les pétrins instrumentés sont des outils de caractérisation directe pendant le pétrissage. Les plus connus sont le farinographe<sup>®</sup>, le mixographe<sup>®</sup> et le consistographe<sup>®</sup>. Ces pétrins sont équipés de mesureurs de couple ou de capteur de pression.

#### **2.2.2.3.1 Pétrins traditionnels**

Inventé en 1927 par un chercheur hongrois, le **farinographe**<sup>®</sup> de Brabender est un pétrin constitué d'une cuve réglée en température dans laquelle deux friseurs horizontaux tournent en sens inverse à des vitesses différentes (63 et 93 rpm respectivement) (figure 12). De 50 à 300 g de farine peuvent être analysés. Les conditions opératoires ont été normalisées (AFNOR, 1998). 4 paramètres sont calculés à partir des farinogrammes obtenus (figure 13) :

- l'hydratation (WACF, *Water absorption capacity*) nécessaire pour atteindre 500 UB (unités Brabender, unités arbitraires)
  - le temps de développement (TD) en min
  - la stabilité (en min)
  - l'intensité de l'affaiblissement à 12 min (AFF 12 min) après la formation de la pâte.

Inventé en 1930, le **mixographe**<sup>®</sup> permet également de mesurer la consistance de la pâte. C'est un pétrin à aiguilles dont le couple moteur est enregistré pendant la formation de la pâte (figure 14). Les paramètres étudiés sont :

- le pic de consistance
- le temps d'apparition du pic de consistance
- la valeur du couple en fin de pétrissage.

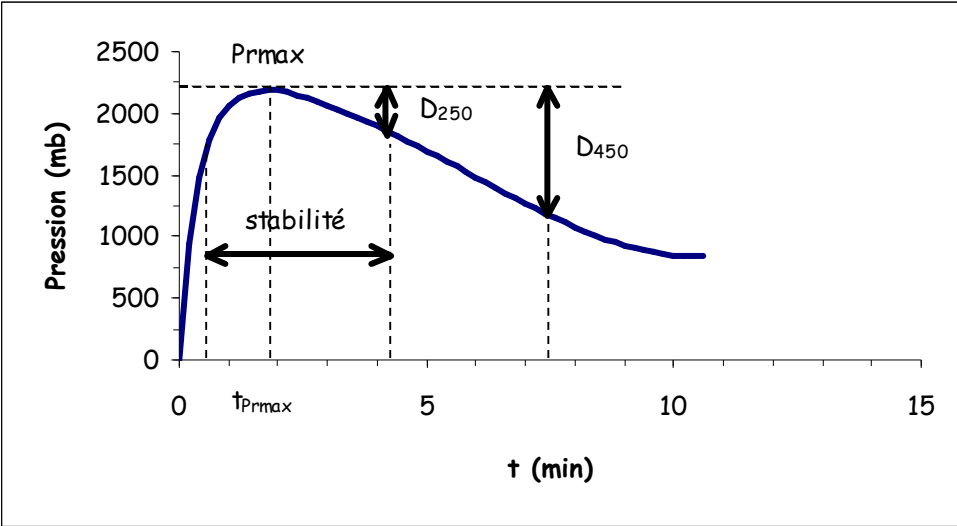


Figure 15. Exemple de courbe obtenue au consistographe® de Chopin.

Le **consistographe**<sup>®</sup> Chopin est un pétrin enregistreur muni d'un capteur de pression dans le corps de la cuve régulée en température. Lors du passage du frasseur devant le capteur, la pâte est comprimée. La pression qui s'exerce dépend de la résistance à l'écoulement de la pâte. Les conditions de travail sont réalisées soit à consistance constante (définition d'une zone d'hydratation adaptée), soit à hydratation constante (définition d'une zone de consistance adaptée). Les paramètres extraits de la courbe (figure 15) de consistance sont :

- la pression maximale ( $P_{\text{rmax}}$ ) en mb ;
- le temps d'apparition de la pression maximale ( $t_{\text{Prmax}}$ ) en s ;
- la stabilité, durée pendant laquelle la pression est supérieure à 80 % de la pression maximale ;
- les affaiblissements à 250 ( $D_{250}$ ) et à 450 s ( $D_{450}$ ), correspondant à la différence entre le  $P_{\text{rmax}}$  et les valeurs de la pression à 250 et 450 s, respectivement.

### 2.2.2.3.2 Apport des pétrins instrumentés

Ce paragraphe fait un état des lieux non exhaustif des pétrins instrumentés existant et tente de montrer l'apport et la spécificité de chaque appareil.

En 1995, Contamine *et al.* ont mis au point un pétrin biscuitier pilote (De Vuurslag<sup>®</sup>) pouvant travailler jusqu'à 6 kg de pâte. Il est instrumenté pour mesurer les températures de la pâte et du fluide circulant dans la double paroi de la cuve. Ces auteurs ont mesuré la température de la pâte et l'apport énergétique pour tenter de relier la qualité des pâtes et des biscuits avec les conditions de pétrissage et la composition biochimique des farines (Contamine *et al.*, 1995 ; Charun, 1997 ; Charun *et al.*, 2000). Ils ont également tenté de réaliser des bilans énergétiques entre l'apport mécanique, l'énergie absorbée et l'énergie dissipée par la pâte.

En 1998, Ameille a instrumenté un pétrin bioréacteur (pouvant pétrir jusqu'à 600 g de pâte) en vue de modéliser les réactions d'oxydoréduction intervenant au cours du pétrissage des pâtes de farines de blé tendre (voir la description dans le chapitre matériel et méthode). Ce travail est une adaptation plus récente de la méthode de Smith et Andrews (1957) pour mesurer la consommation d' $O_2$  des pâtes, principalement attribuée aux phénomènes oxydatifs. L'appareil mis au point est plus précis que celui développé par Smith et Andrews en 1957. Le principe est basé sur la mesure de la teneur en oxygène dans l'atmosphère gazeuse entourant

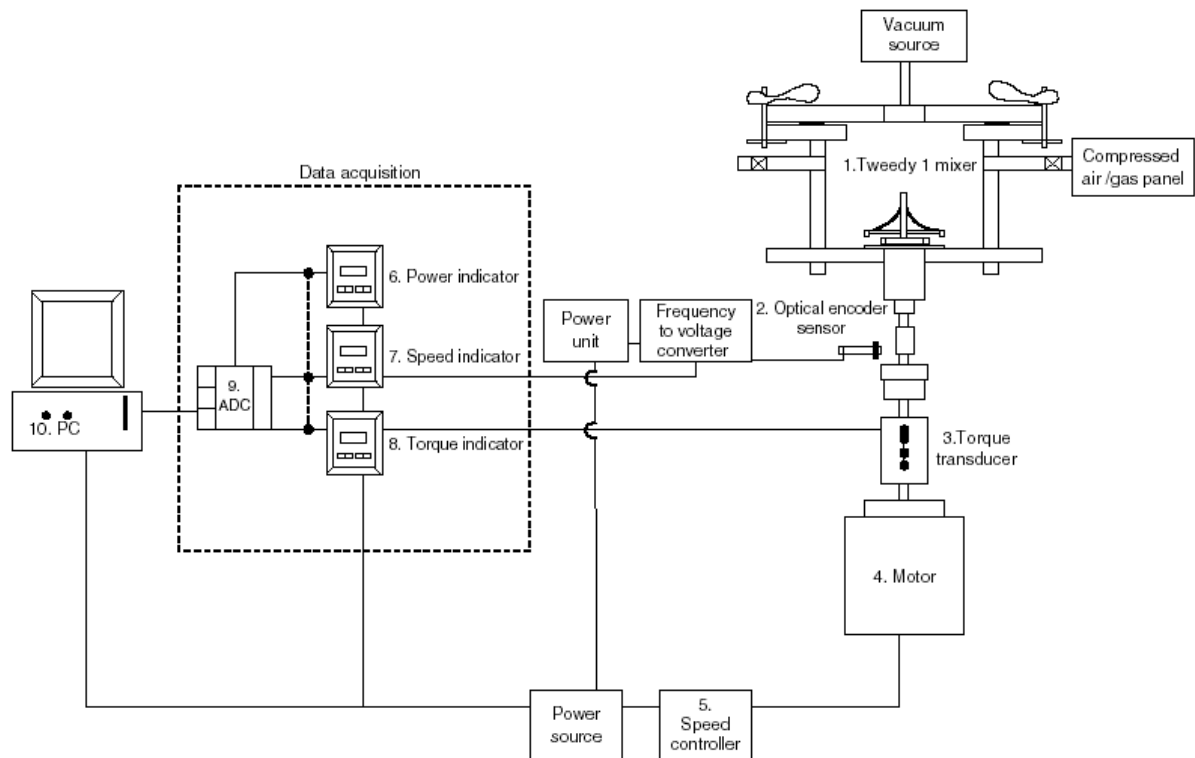


Figure 16. Schéma de principe du pétrin instrumenté par Chin et Campbell (2005a)

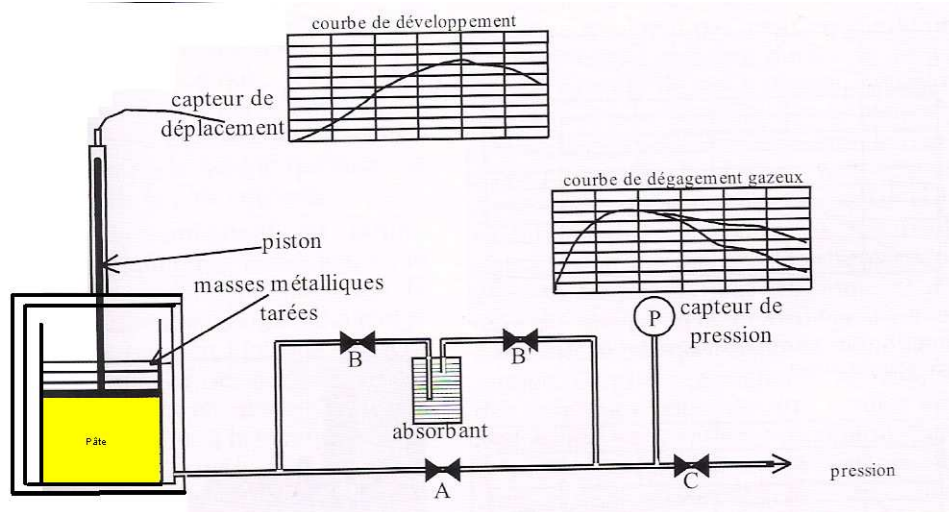


Figure 17. Principe de fonctionnement du rhéofermentomètre

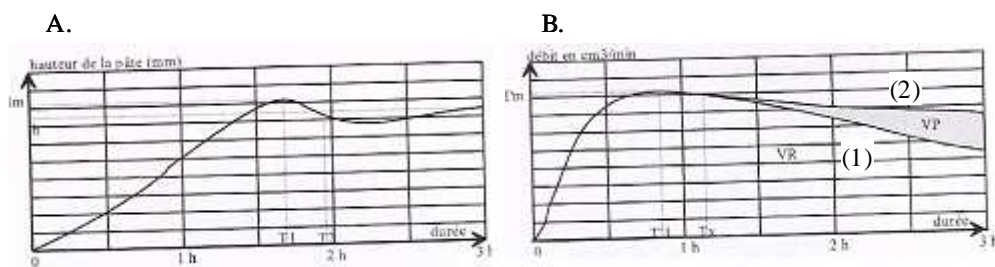


Figure 18. Exemples de courbes obtenues au rhéofermentomètre. A. courbe de développement. B. courbes de dégagement gazeux (débit de gaz en fonction du temps) obtenues en piégeant le  $\text{CO}_2$  libéré (1) ou non (2). VR : Volume de gaz retenu par la pâte ( $\text{cm}^3$ ). VP : Volume de gaz perdu ( $\text{cm}^3$ ).

la pâte isolée de l'atmosphère extérieure. Cet appareil permet d'étudier l'impact des conditions de pétrissage et de la formulation des farines (composition biochimique, ajout d'enzyme d'oxydoréduction, de substrats redox ou d'hydrolases) sur la consommation d'oxygène. Le bioréacteur, également muni d'un capteur de couple au niveau du frasseur a été utilisé par Cehlay (2000), puis dans le cadre de ce travail de thèse (Levavasseur *et al.*, 2006) pour caractériser les pâtes selon des paramètres rhéologiques définis. Les contraintes mécaniques du système nécessitent de pétrir des pâtes surhydratées (70 % d'eau pour 100 g de farine), ce qui présente l'avantage de ralentir les phénomènes d'oxydation, mais rend les phénomènes observés sur les paramètres de couple difficilement comparables avec ceux déterminés sur des pâtes boulangères nettement moins hydratées. La mise au point du sitoxygraphe a pour but de transposer la mesure de la consommation d'oxygène sur un pétrin pilote réalisant des pâtes dont l'hydratation est dans la gamme des conditions boulangères.

Chin et Campbell (2005a) ont instrumenté un pétrin de laboratoire de type tweedy équipé d'un capteur de couple, d'un mesureur de vitesse de bras permettant de déterminer l'apport d'énergie (*work input*) à la pâte (figure 16). A l'aide d'un système étanche permettant de faire varier la pression au sein de la cuve, ces auteurs ont étudié l'effet des conditions de pétrissage (vitesse, apport d'énergie, type de farine, ingrédients) et de pression dans l'atmosphère environnant la pâte, sur l'aération des pâtes et la rhéologie de celles-ci (Chin et Campbell, 2005a et 2005b, Chin *et al.*, 2005a et 2005b).

### **2.2.3 Rhéofermentomètre (outil de mesure de la production et de la rétention de dioxyde de carbone)**

Le rhéofermentomètre est un appareil de mesure de la quantité de gaz carbonique produit en cours de la fermentation (figure 17) dans un système étanche. Deux configurations sont possibles. Dans la première (vanne B fermée), l'échantillon de pâte levurée est placé dans une cuve thermostatée, sur celle-ci des masses métalliques tarées sont reliées à un piston. La mesure du déplacement de ce piston permet de déterminer la courbe de développement (augmentation du volume de la pâte) (figure 18.A.). La pression dans le système étanche augmente par le déplacement d'un volume d'air et permet la détermination de la courbe de dégagement gazeux total (figure 18.B.). Dans la seconde configuration (vanne A fermée, vannes B et B' ouvertes), le CO<sub>2</sub> libéré (pâte poreuse) est absorbé par la chaux. Dans ce cas, la pression gazeuse mesurée est inférieure et l'aire sous la courbe représente le volume de



CO<sub>2</sub> retenu dans la pâte (VR). La différence entre les aires sous la courbe de dégagement gazeux des deux conditions d'utilisation permet de déterminer le volume de CO<sub>2</sub> perdu (VP). Ce système permet de déterminer le coefficient de rétention de CO<sub>2</sub> dans la pâte (volume perdu sur volume retenu) mais aussi le temps à partir duquel la pâte est devenue perméable (diffusion du gaz).

## **2.3 Modifications biophysicochimiques provoquées par le pétrissage**

### **2.3.1 Rôle des transferts énergétiques**

Le pétrissage entraîne un apport de travail mécanique intense, déterminant pour la qualité de la pâte (Tanaka et Bushuk, 1973). L'énergie mécanique fournie par le bras en mouvement est partiellement convertie par dissipation visqueuse en un apport d'énergie thermique à la pâte.

#### **2.3.1.1 Apport d'énergie mécanique**

Pour un type de pétrin donné (géométrie de la cuve et des bras), la quantité d'énergie mécanique fournie à la pâte dépend de la vitesse du bras, du temps de pétrissage, et du couple (moment des forces de résistance de la pâte à l'entraînement).

Elle correspond à la somme des énergies spécifiques instantanées (V) :

$$(V) \quad E = \int_{t_0}^{t_{\text{final}}} C(t) \omega(t) \partial t$$

avec,

C(t) : couple instantané exprimé en N.m

$\omega(t)$ : vitesse angulaire instantanée en rad.s<sup>-1</sup>

Expérimentalement, cette relation s'exprime :

$$(VI) \quad E = \sum C(t) \omega(t) \Delta t$$





Dans cette dernière relation, l'intervalle de temps ( $\Delta t$ ) doit être suffisamment petit, pour que le calcul soit précis. Dans les pâtes biscuitières, Contamine *et al.* (1995) ont montré que la quantité d'énergie est reliée linéairement au produit du carré de la vitesse par le temps ( $V^2t$ ). Cette relation est vérifiée dans leurs conditions de travail en considérant la pâte comme un fluide visqueux (Newtonien).

Lors du pétrissage, la consistance de la pâte augmente, atteint un maximum avant de chuter progressivement. Lorsque la durée de pétrissage se prolonge, on observe une chute importante de la consistance de la pâte correspondant au surpétrissage. La notion de surpétrissage est subjective et pas obligatoirement associé à un effet pénalisant. Tout dépend des propriétés des pâtes désirées. Cependant, le surpétrissage est fréquemment associé à l'apparition d'un fort collant qui peut être pénalisant lors de la manipulation de la pâte.

Pour des conditions de pétrissage identiques par ailleurs, l'augmentation de la vitesse de pétrissage s'accompagne d'une augmentation des forces de frottement au sein de la pâte. En 1972, Kilborn et Tipples ont observé l'existence d'un seuil minimal de vitesse en dessous duquel le volume du pain diminuerait fortement dans le procédé Chorleywood (CBP), et obtenu un développement optimum de la pâte pour un apport d'énergie minimum de 9 kJ.kg<sup>-1</sup> de pâte. De plus, selon ces auteurs, un pétrissage avec un apport d'énergie constant (vitesse variable) permettrait de réduire considérablement le temps de développement de la pâte.

### ***2.3.1.2 Énergie absorbée dans la pâte, énergie dissipée par celle-ci***

En pratique, l'énergie absorbée par la pâte est mesurée par son élévation de la température pendant le pétrissage (Contamine *et al.*, 1995 ; Charun *et al.*, 2000). Une part de l'énergie transmise par le bras en mouvement est absorbée par la pâte, l'autre non retenue est dissipée à l'extérieur. La mise au point de pétrin permettant la régulation de la température de la cuve du pétrin (système de liquide circulant dans une double enveloppe), permet de mesurer cette énergie dissipée (Contamine *et al.*, 1995). De même, la température de l'atmosphère entourant la pâte peut évoluer en fonction des échanges. Ainsi, le bilan des échanges montre qu'il est impossible de dissocier le système pâteux de son milieu. Seule compte l'énergie dissipée dans la pâte.



Tout d'abord, c'est principalement l'apport d'énergie mécanique qui détermine l'énergie absorbée, mais la valeur de l'énergie spécifique instantanée va influencer les variations plus ou moins rapides de la température de pâte.

Ensuite, l'évolution de la température de la pâte a des conséquences sur les caractéristiques de la pâte. D'après Hlynka (1962), la consistance augmente avec la température de la pâte. A consistance égale, la vitesse de développement de la pâte augmente avec la température de la pâte. Au contraire, Bloksma et Nieman (1975) indiquent que la viscosité de la pâte passe par un minimum entre 40 et 45 °C.

### **2.3.2 Rôle des composants de la pâte lors du pétrissage**

#### **2.3.2.1 Levures**

Quand la quantité de levure ajoutée, en général du *S.cerevisiae*, est de 2,5 % par rapport à la masse de farine  $2.10^{11}$  cellules sont inoculées par kg de farine, (Guinet, 1978). L'ensemencement réalisé a pour conséquence d'augmenter la quantité d'enzymes dans le milieu (Potus, 1997). Dès la phase de pétrissage, la fermentation débute sous l'action des levures. A partir des glucides libres ou libérés par les amylases de la farine, les levures produisent du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et des acides organiques (Roussel et Chiron, 2002). Le CO<sub>2</sub> produit est responsable de l'expansion des bulles de gaz pendant la fermentation et la cuisson. Pendant le pétrissage, celui-ci est libéré de la pâte par brassage (Celhay, 2000).

#### **2.3.2.2 Eau**

En général, la teneur en eau d'une farine se situe autour de 15 % par rapport à la masse de farine humide en fin de mouture. Plus une farine est humide plus elle risque de se détériorer rapidement par l'activation des réactions d'hydrolyse et d'oxydation et la mise en place de conditions favorables au développement des moisissures, levures et bactéries.

Dans la pâte hydratée à 45 % d'eau pour 100 g de pâte, une part de l'eau (10 %) provient de la farine, l'autre part est ajoutée dans la cuve du pétrin. Elle permet la formation de la pâte lors du mélange des ingrédients lors du frasage. Elle favorise les réactions biochimiques et sert également d'agent plastifiant, c'est-à-dire qu'elle abaisse les températures auxquelles les protéines et l'amidon passent d'un état solide et rigide à un état caoutchoutique (pâte).

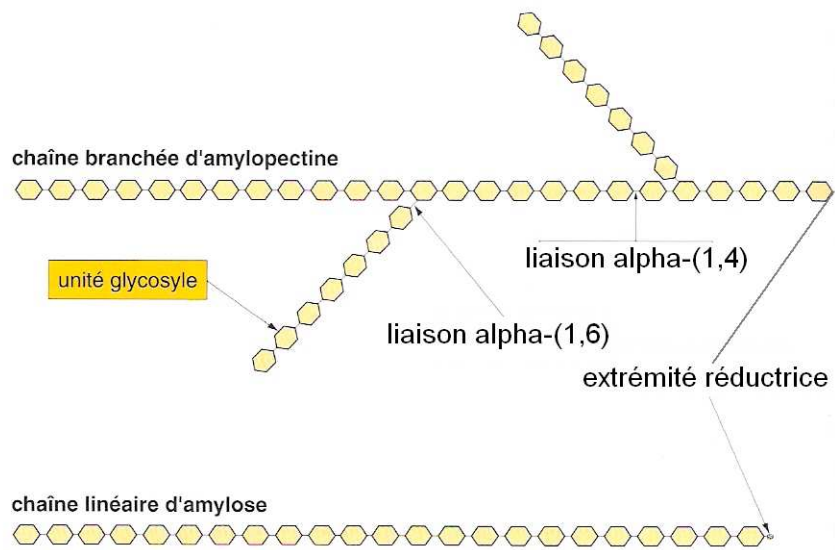


Figure 19. Structure de l'amylose et de l'amylopectine (d'après Feillet, 2000)

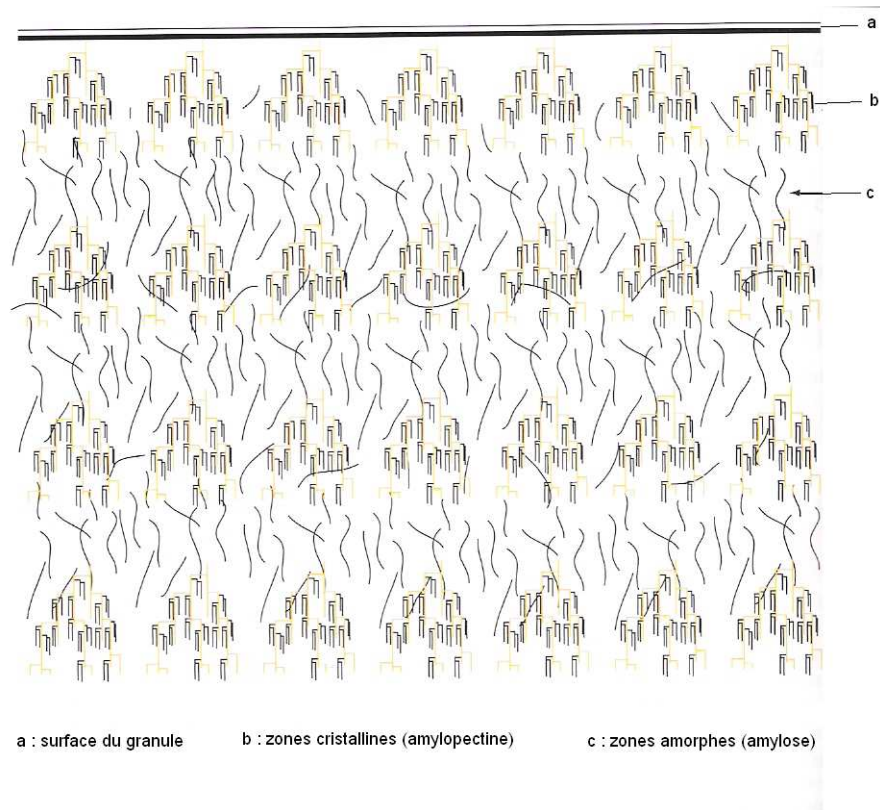


Figure 20. Organisation supra-moléculaire du granule d'amidon (d'après Feillet, 2000).

### **2.3.2.3 Matières minérales**

Le taux de cendres définit le type d'une farine. Il dépend du taux d'extraction de celle-ci. En effet, les farines dont le taux de cendres est élevé sont plus riches en sons (enveloppe du grain de blé). Actuellement, le type le plus courant est le type 55 (taux de cendres compris entre 0,5 et 0,6 % par rapport à la matière sèche).

### **2.3.2.4 Chlorure de sodium (NaCl)**

En panification, le chlorure de sodium est un exhausteur de goût. Il est ajouté quelques minutes avant la fin du pétrissage, provoquant une augmentation brusque de la consistance de la pâte (Feillet, 2000). Les quantités ajoutées varient selon les recettes et le type de pain fabriqué, mais en général, la dose ajoutée se situe autour de 2 % par rapport à la farine. Les directives du plan national nutrition et santé recommandent des teneurs en chlorure de sodium inférieures ou égales à 1,7 %.

Le premier effet du chlorure de sodium ajouté dans la pâte est la modification de la force ionique du milieu. Par conséquent, il pourrait modifier la répartition des interactions de faibles énergies entre les protéines du gluten (Preston, 1981), en diminuant leur solubilité et en favorisant leur agrégation. Dans une étude au consistographe<sup>®</sup>, Malet (2005) observe plutôt un gain de stabilité des pâtes qu'une augmentation de consistance, ainsi qu'une diminution d'extractibilité des protéines et une variation dans les proportions relatives de chacune des fractions protéiques.

Le chlorure de sodium est par ailleurs, décrit comme un inhibiteur de la LOX (Nicolas, 1978). Il est d'usage de l'ajouter en fin de pétrissage, afin de favoriser les réactions d'oxydation et par conséquent l'obtention de pains à la mie blanche.

### **2.3.2.5 Glucides et polysides**

Les glucides représentent 80 % de la farine, peu sont sous forme d'oses (1 %). La plupart d'entre eux sont sous formes polysidiques dont l'amidon (95 % des glucides) et les pentosanes (2,5 % par rapport aux glucides).

**L'amidon** est un composé que l'on retrouve dispersé dans la phase protéique de la pâte. Il est présent dans la farine sous forme de grains contenant deux types de polysides qui se distinguent essentiellement par leur degré de branchement (figure 19) : l'amylose (26-28 %)

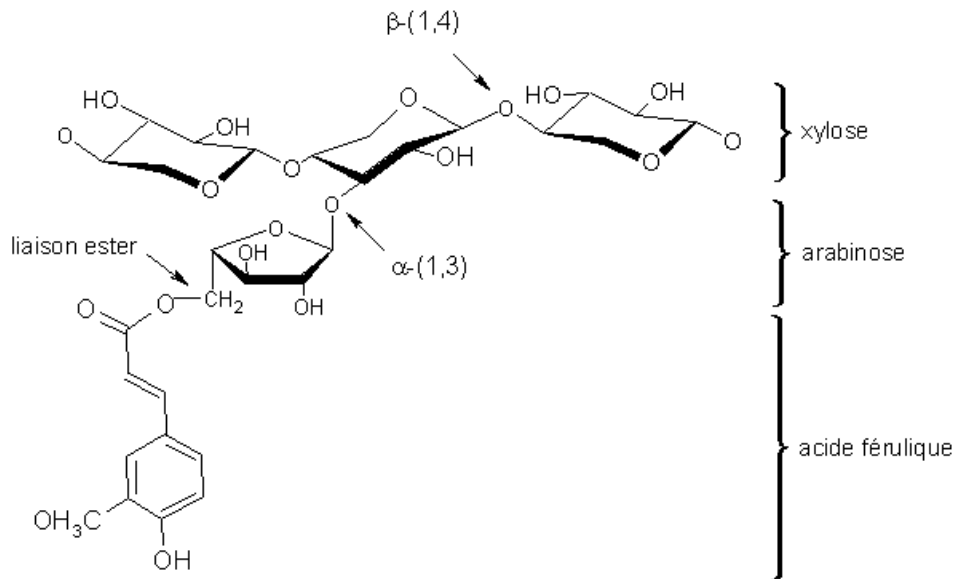


Figure 21. Structure chimique des arabinoxylyanes de blé (d'après Fincher et Stone, 1986)

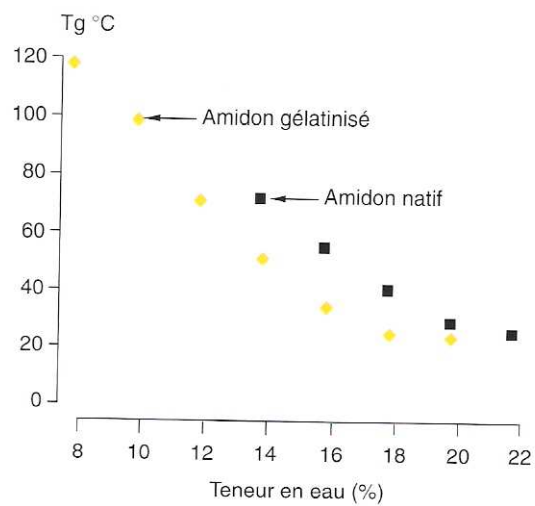


Figure 22. Effet la teneur en eau et de l'état de l'amidon sur la température de transition vitreuse (Feillet, 2000)

composé de chaîne linéaire (liaison  $\alpha$ -(1,4)) et l'amylopectine (72-74 %) composé de chaînes principales (liaison  $\alpha$ -(1,4)) ramifiées (liaison  $\alpha$ -(1,6)). Les chaînes linéaires apportent une plus grande viscosité que les chaînes ramifiées. L'amidon est organisé sous forme de granules (figure 20), l'endommagement partiel de ces granules lors de la mouture permet l'accessibilité des enzymes hydrolytiques. Issus de la paroi des cellules de l'albumen, plusieurs types de polysaccharides non amylacés sont présents dans la farine : arabinogalactanes et arabinoxylanes notamment. Les premiers constituent **les pentosanes**. Présents de façon majoritaire, les arabinoxylanes sont constitués d'une chaîne linéaire (squelette) d'unités de  $\beta$ -D-xylopyranose ramifiées en  $\beta$ -(1,4) sur laquelle sont substitués des résidus d' $\alpha$ -L-arabinofuranose par des liaisons  $\alpha$ -(1,3 et/ou  $\alpha$ -(1,4) (figure 21). La distribution des résidus d'arabinose sur la chaîne de xylose est irrégulière. Enfin, certains de ces résidus sont estérifiés par une molécule d'acide férulique (AF) sur le carbone 5.

Les arabinoxylanes peuvent être séparés en deux fractions, l'une (20 à 40 %), soluble dans l'eau (WEAX) et l'autre insoluble (WUAX). L'ensemble des arabinoxylanes ne présentent pas de différences structurales majeures (Rouau, 1996), seule la taille des macromolécules influence leur solubilité dans l'eau. **Rouau et al. (1994)** ont montré que les pentosanes insolubles ont une forte capacité d'adsorption de l'eau (10 fois leur poids) et que les pentosanes solubles peuvent former des solutions de haute viscosité et donner des gels lors de l'oxydation par des agents générateurs de radicaux libres (agents chimiques, POD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LOX/acide linoléique, laccase/O<sub>2</sub>).

### 2.3.2.5.1 Rôle de l'amidon

Lors de la mouture, les granules d'amidon peuvent être endommagés. Dans les granules lésés, les chaînes de glucose sont rendues accessibles aux amylases ce qui permet en début de fermentation de mettre à la disposition des levures une quantité plus importante de sucres fermentescibles et accélérer la production gazeuse. Pendant le pétrissage, la libération des sucres fermentescibles est progressive et atteint un taux d'environ 2 mg.g<sup>-1</sup> ms (Potus et al., 1994).

Par ailleurs, la modification de la structure du grain d'amidon a pour conséquence l'augmentation de son pouvoir d'adsorption de l'eau. La capacité de rétention d'eau de la farine augmente avec le taux d'amidon endommagé. Lors de la formation de la pâte, si la quantité d'eau est limitante, il peut entrer en compétition avec le gluten vis-à-vis de l'eau et entraver ainsi le développement optimum du réseau protéique. Par ailleurs, l'élévation de la



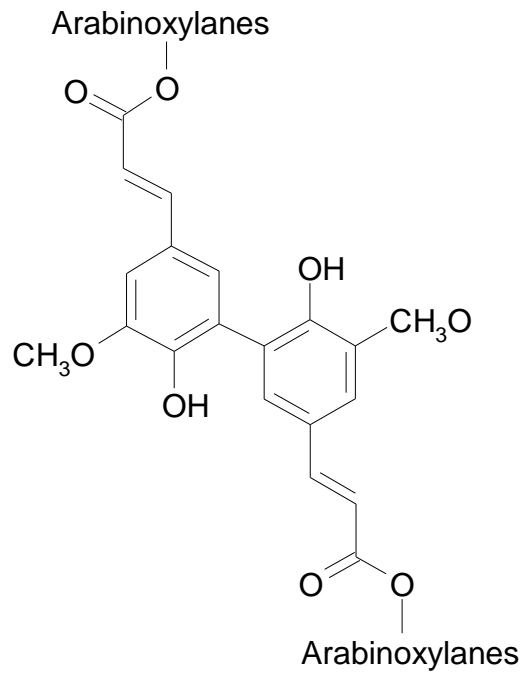


Figure 23. Exemple de liaison covalente entre des résidus d'acide férulique reliant deux chaînes d'arabinoxylanes

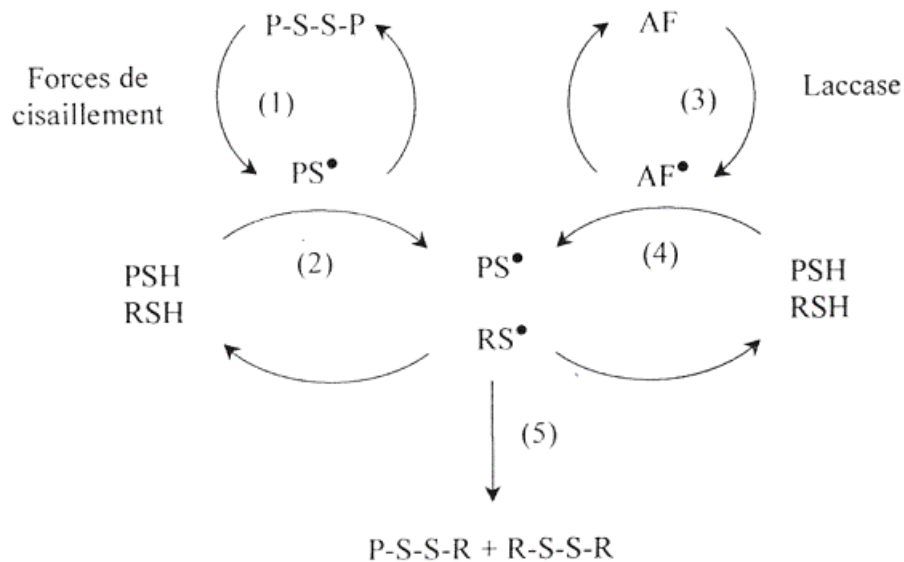


Figure 24. Réactions proposées pour expliquer l'action de l'AF en présence ou non de laccase pendant le pétrissage (Labat, 2000). PSSP : protéine oxydée ; PSH : protéine réduite ; PS• : radical thiyl protéique ; RSSR : peptide oxydé ; RSH : peptide réduit ; RS• : radical thiyl peptidique.

teneur en eau lors de la formation de la pâte a pour conséquence de diminuer la température de transition vitreuse de l'amidon (figure 22). Après le pétrissage, l'amidon est partiellement hydrolysé pour fournir les sucres fermentescibles aux levures, et lors de la cuisson, la gélatinisation de celui-ci contribue à figer la structure du pain.

### 2.3.2.5.2 Rôle des pentosanes

Les pentosanes jouent un rôle important dans l'établissement des propriétés rhéologiques des pâtes, d'une part en participant à la compétition vis-à-vis de l'eau avec les protéines du gluten et l'amidon endommagé et d'autre part en modifiant la viscosité de la phase aqueuse de la pâte lors de réaction de gélification oxydative (Izydorczyk *et al.*, 1991).

Dans la pâte, la forte capacité d'adsorption d'eau des pentosanes influence la répartition de celle-ci. A faible dose, les AX solubles favorisent la répartition homogène de l'eau et l'établissement de liaisons hydrogène avec l'amidon et les protéines.

En présence d'agent oxydant, la gélification des arabinoxylanes hydrosolubles est provoquée par la formation de liaisons covalentes par l'intermédiaire de l'acide férulique (figure 23). La gélification oxydative a été décrite par Figueroa-Espinoza *et al.* (1998c) en utilisant la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* ou la manganèse peroxidase comme catalyseur. Lors de la gélification oxydative des arabinoxylanes, des liaisons covalentes sont formées mais des liaisons faibles de type liaison hydrogène jouent aussi un rôle important. Carvajal-Millan *et al.* (2005c) ont clairement démontré, en faisant varier le degré de féruloylation des arabinoxylanes hydrosolubles, le rôle central de l'acide férulique aussi bien pour la gélification des pentosanes que pour les propriétés rhéologiques et structurales du réseau obtenu. Lors de la formation des gels, l'AF est consommé et des dimères sont formés, reliant de façon covalente les chaînes d'arabinoxylanes entre elles, de même la formation de trimères d'AF est observée en faible quantité. Des enchevêtrements physiques pourraient compléter l'effet des interactions biochimiques pour contribuer à la structure finale du gel d'arabinoxylanes solubles. La gélification oxydative induite par les laccases entraîne la formation d'un gel peu stable du fait de la réactivité des radicaux formés par l'enzyme après formation du gel, qui vont dégrader celui-ci, nécessitant l'inactivation thermique de l'enzyme pour empêcher la formation de radicaux réactifs et conserver un gel avec des propriétés de dureté.

D'après Labat *et al.* (2000b), l'AF et l'AS estérifiés à des composés de faible poids moléculaires pourraient être impliqués dans l'affaiblissement des pâtes au surpétrissage.

**Tableau 4. Classification des protéines selon leur solubilité (d'après Osborne).**

|                             | <b>Classification</b>   | <b>Solubilité</b>  | <b>Mr (kDa)</b> |
|-----------------------------|-------------------------|--|-----------------|
| <b>Protéines solubles</b>   | <i>Albumines</i>        | - Dans les solutions salines<br>- Lors de dialyse contre de l'eau.   | 16              |
|                             | <i>Globulines</i>       | - Dans les solutions salines<br>- Précipitées par dialyse contre de l'eau.   | 16-20           |
| <b>Protéines insolubles</b> | <i>Gliadines</i>        | - Dans les solutions aqueuses à teneur élevée en éthanol 70 %.   | 25-75           |
|                             | <i>Gluténines (BPM)</i> | - Dans les solutions aqueuses d'acide acétique ou alcalines diluées ou par des solutions d'agents dissociants (SDS, savon, urée...). | > 100           |
|                             | <i>Gluténines (HPM)</i> | - Insolubles dans les solutions précédentes.   | > 1000          |

Garcia (*communication personnelle*) a observé que l'AF libre, en présence d'AF estérifié, est préférentiellement oxydé par la peroxydase. Les radicaux féruloyl libres formés sont réactifs et vont co-oxyder les résidus AF estérifiés. Ces résultats indiquent que la présence d'AF libre dans la pâte (mais aussi d'AS), même en petite quantité pourrait avoir des conséquences rhéologiques importantes puisqu'en étant oxydés, ils forment des espèces radicalaires qui semblent réactives et vont oxyder chimiquement des composés de la pâte en étant régénérés. Un mécanisme similaire a été proposé par Labat *et al.* (2000a) pour expliquer l'effet de l'ajout d'AF dans la pâte lors du pétrissage en présence de laccase (figure 24).

Par ailleurs, l'effet de la fraction insoluble des arabinoxylanes (WUAX) est plutôt négatif en panification en provoquant une baisse de la machinabilité de la pâte (Rouau *et al.*, 1994). De plus, la forte capacité d'adsorption d'eau des pentosanes insolubles modifie le développement du gluten en entrant en compétition avec ce dernier pour la fixation de l'eau (Wang *et al.*, 2003). Pour remédier à cela, ces auteurs proposent d'allonger le temps de pétrissage et/ou d'ajouter du NaCl. Par ailleurs, ils font l'hypothèse que les pentosanes interagissent directement avec le gluten et diminuent le taux d'agrégation des protéines du gluten. L'utilisation d'endoxylanases spécifiques permet de limiter l'effet néfaste de la fraction insoluble des pentosanes en les rendant partiellement solubles sans dégrader les pentosanes de la fraction soluble.

### **2.3.2.6 Protéines**

Le blé renferme un grand nombre de protéines : protéines de structure, de réserve ou encore ayant une fonction biologique. Le pourcentage de protéines varie de 7 à 15 % et constitue un des premiers indicateurs de la qualité des blés. L'aptitude d'une farine de blé à la panification dépend principalement d'une teneur élevée en protéines, notamment en gluténines. On qualifie de « forte » une farine ayant un fort taux de protéines, qui déterminent une élasticité élevée de la pâte boulangère. Globalement en panification anglosaxonne, une farine « forte » donne un pain plus volumineux qu'une farine dite « faible » qui possède un faible taux de protéines. Outre l'aspect quantitatif des protéines, leur nature influence particulièrement la qualité boulangère (Finney et Baltimore, 1948 cités par Labat, 2000).

Le gluten, constitué de gliadines, de gluténines et d'une partie de lipides, correspond à la fraction insoluble dans l'eau des farines. Il peut donc être obtenu par lavage à l'eau (lixiviation) de la pâte de farine de blé. D'un point de vue technologique, ses propriétés viscoélastiques contribuent majoritairement à la ténacité de la pâte.

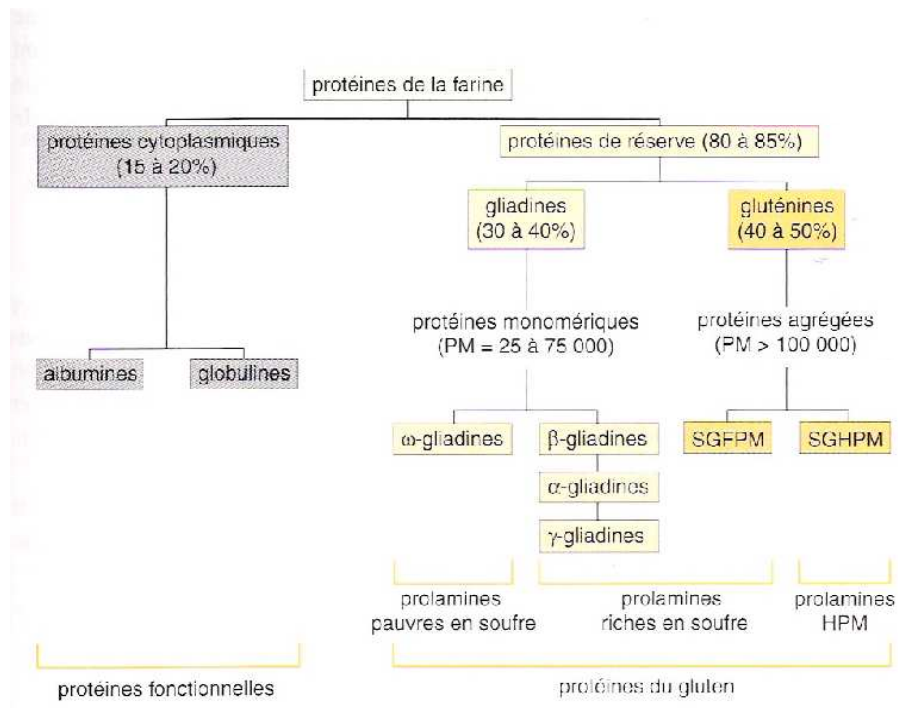


Figure 25. Classification des protéines selon Osborne (1907) et Shewry (1986). SG-HPM : sous unités gluténines de haut poids moléculaire ; SG-FPM ; sous unités gluténines de faible poids moléculaire (d'après Feillet, 2000).

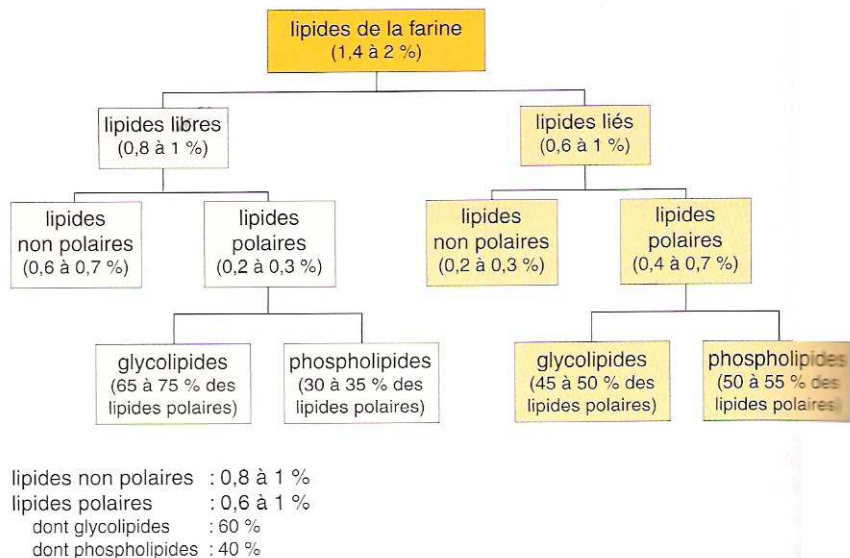


Figure 26. Composition en lipides libres et liés de la farine (d'après Feillet, 2000).

Depuis 1907, la classification d'Osborne sépare les protéines en quatre grands groupes suivant leur solubilité : les albumines solubles dans l'eau, les globulines solubles dans l'eau salée, les gliadines solubles dans les solutions alcooliques et les gluténines insolubles dans les solutions précédentes (tableau 4). Une classification plus récente a été proposée par Shewry *et al.* (1986) :

- Les albumines et globulines représentent 8 % des protéines de la farine dans lesquelles se trouvent la plupart des enzymes :  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylases, protéases, oxydoréductases, notamment
- Les gliadines (ou prolamines) sont de protéines monomériques, riches en résidus glutamines et prolines. Elles représentent environ 40 % des protéines de la farine et sont divisées en deux groupes en fonction de leurs propriétés biologiques, biochimiques et de leurs origines génétiques (figure 25) : les gliadines pauvres en soufre ( $\omega$ -gliadines) et les gliadines riches en soufre ( $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\gamma$ -gliadines) (Shewry *et al.*, 1986). Darde (2001) distingue ces 4 classes selon leur mobilité électrophorétique en milieu acide. Lors de la formation du réseau de gluten, les gliadines s'associent entre elles par liaisons hydrogène, interactions hydrophobes et formation de fibrilles. Leur composition en acides aminés leur permet seulement de réaliser des ponts disulfures intra-moléculaires. Les gliadines sont principalement impliquées dans la composante visqueuse du gluten et donc responsables en grande partie des propriétés d'adhésion de la pâte. Elles sont capables de former des ponts disulfures intramoléculaires uniquement.
- Les gluténines (environ 50 % des protéines de la farine) sont des protéines polymérisées et agrégées résultant de la polymérisation des sous unités gluténiques de haut poids moléculaire (SG-HPM) et des sous unités gluténiques de faible poids moléculaire (SG-FPM). Elles sont partiellement solubles dans les acides et les bases dilués, dans les solutions d'urée ou les détergents (Darde, 2001). Les SG-HPM contiennent approximativement 1 à 2 % d'acides aminés soufrés et présentent un caractère hydrophobe voisin de celui des  $\omega$ -gliadines. Les SG-FPM représentent 60 à 80 % des gluténines totales. Les sous unités gluténiques sont capables de s'associer par l'intermédiaire de ponts disulfures intermoléculaires.

Les caractéristiques biochimiques des protéines insolubles leur confèrent leurs propriétés (Feillet, 2000). Elles ont une faible teneur en acides aminés ionisables. En revanche, elles sont riches en acides aminés hydroxylés et en glutamine, facilitant la formation de liaisons hydrogène à l'origine des propriétés d'adhésion et de cohésion du

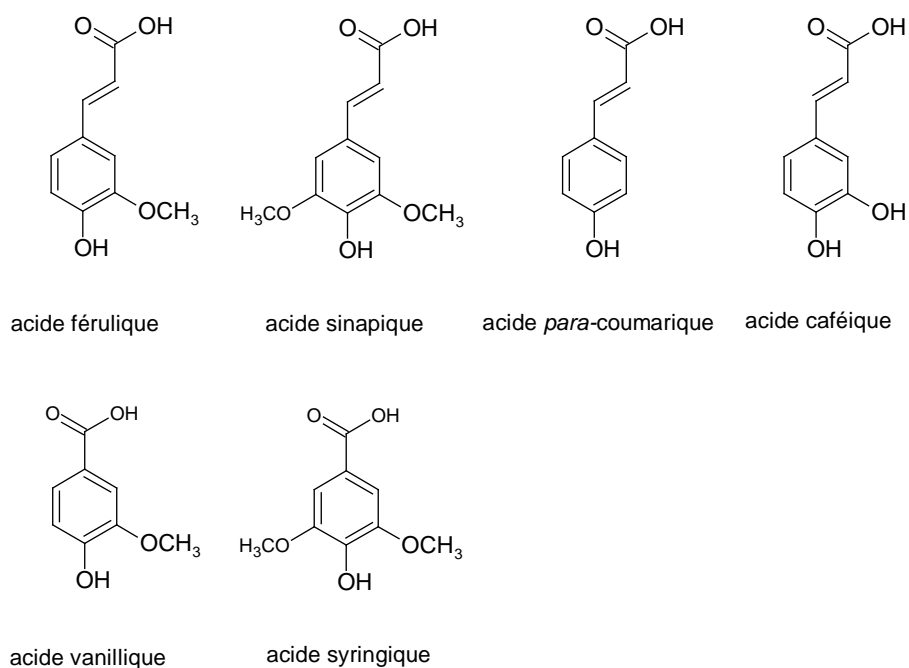


Figure 27. Principaux acides phénoliques contenus dans la farine.

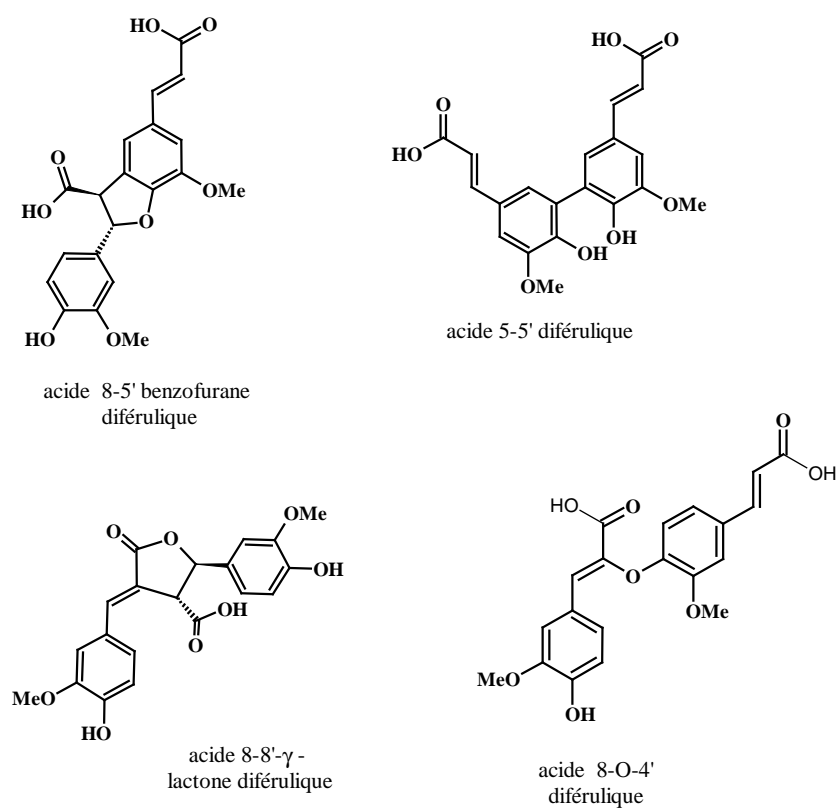


Figure 28. Principaux dimères d'acide férulique présents dans la farine et dans la pâte.

gluten. Elles sont également riches en acides aminés apolaires permettant l'agrégation des protéines, la fixation des lipides et des glycolipides par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. Enfin, elles sont capables de former des ponts disulfures intermoléculaires entraînant l'association de gluténines de haut poids moléculaire appelée macropolymère de gluténine (Don *et al.*, 2003a ; Don *et al.*, 2003b ; Don, 2005).

### **2.3.2.7 Lipides**

Les lipides sont des composés minoritaires de la farine (de 1,5 à 2 % par rapport à la masse de matière sèche). On distingue deux grandes catégories de lipides au sein de la farine : d'une part les lipides libres qui sont extractibles par l'éther de pétrole, et d'autre part les lipides liés qui ne peuvent pas être extraits par ce solvant (figure 26). Les lipides libres sont composés principalement de lipides non polaires (notamment les triglycérides) alors que les lipides liés sont constitués majoritairement de lipides polaires (phospholipides et glycolipides). Ils ont un rôle important aussi bien pendant la conservation que lors de l'utilisation des farines (Pomeranz, 1967 ; Panozzo *et al.*, 1993). En effet, la libération des acides gras par hydrolyse ainsi que l'oxydation de ces composés lors de la maturation de la farine seraient à l'origine de l'amélioration des qualités boulangères de la farine en panification (Nicolas, 1979; Castello *et al.*, 1998) puis à leur détérioration lorsque le stockage se prolonge. L'oxydation des lipides (formation initiale d'hydroperoxydes) peut se produire soit par oxydation chimique (Liavonchanka, 2006) soit par l'action des lipoxygénases (brash, 1999) (voir chapitre 2.4.3.1.1, le système LOX-PUFA).

### **2.3.2.8 Acides phénoliques**

Situé dans les couches périphériques du grain de blé, leur teneur est de l'ordre de 110  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ms (Louarme *et al.*, 2004). Les acides phénoliques de la farine sont principalement des acides hydroxycinnamiques, comme les acides férulique (AF), sinapique (AS), *p*-coumarique (ApC) et caféique, et des acides hydroxybenzoïques, comme les acides vanillique (AV) et syringique (ASR) (figure 27). En conditions oxydantes, la plupart peuvent se dimériser. C'est le cas de l'AF, dont les dimères adoptent différentes structures (figure 28). L'AF est l'acide phénolique majoritaire (environ 90 %), présent essentiellement sous une forme liée, estérifiée aux arabinoxylanes. Une faible proportion d'AF est libre (soluble). L'AS, deuxième acide le plus abondant, est quant à lui plutôt présent sous forme soluble libre (Labat *et al.*, 2000b). Extraits à partir de 6 gluten commerciaux, les quantités totales d'AF et



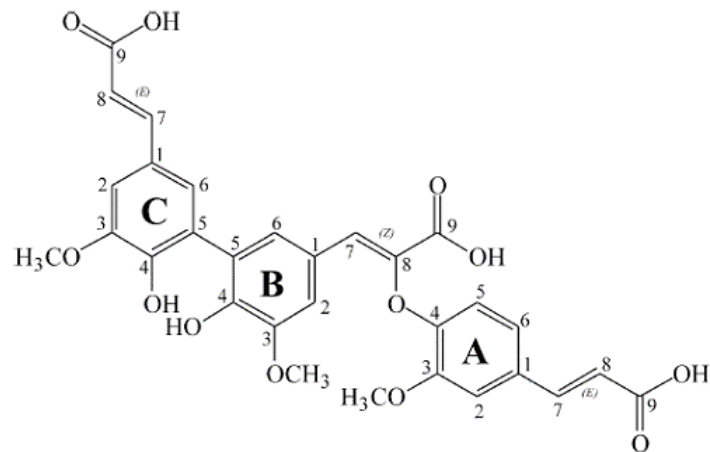


Figure 29. Structure du trimère d'AF (d'après Rouau *et al.*, 2003)

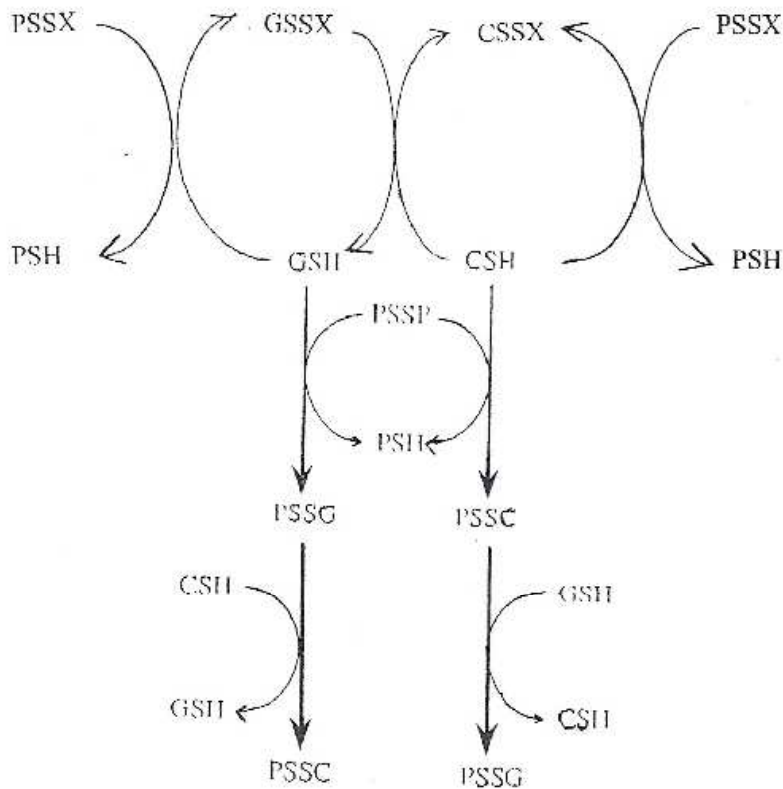


Figure 30. Schéma des échanges thiols/disulfures intervenant dans la pâte lors du pétrissage (d'après Potus, 1997). PSSP : protéine oxydée ; PSH : protéine réduite ; CSSC : cystéine oxydée ; CSH : cystéine réduite ; GSSG : glutathion oxydé ; GSH : glutathion réduit ; XSH : peptide réduit ; XSSX : peptide oxydé ; couplage mixte : PSSX, GSSX, CSSX, CSSP, GSSP.

d'AS, libres et liés, sont respectivement comprise entre 4,9 et 17,7  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  et 1,4 et 3,5  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (Labat *et al.*, 2000b). Louarme *et al.* (2004) ont également dosé les teneurs en acides phénoliques des farines de variétés pures de l'année 2003 par CLHP-UV.

Des quantités comprises entre 77 et 115  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ms pour l'AF et entre 6 et 13  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ms pour l'AS ont été mesurées. Dans les farines, la part d'AS libre est plus importante (26 % de la quantité totale en moyenne) tandis que celle d'AF libre est en moyenne de 10 % par rapport à la quantité totale dosée. Dans la farine, les quantités de dimères d'AF sont minoritaires. Les autres acides phénoliques évoqués ci-dessus sont à l'état de traces dans le gluten et la farine.

Récemment, Carvajal-Millan *et al.* (2005a) ont détecté la présence de trimères d'AF (figure 29). Barron *et al.* (2007) ont étudié la répartition des AF dans les couches périphériques du grains de blé mature, confirmant que l'AF peut être utilisé comme marqueur du fractionnement du grain de blé.

Enfin, il est utile de signaler que l'AF possède des propriétés antioxydantes (Kikuzaki *et al.*, 2002).

### **2.3.2.9 Oxygène**

L'oxygène est souvent oublié puisqu'il est présent dans l'air. Or, c'est un acteur indispensable pour les réactions d'oxydation. Des pâtes pétries sous atmosphère pauvre en oxygène se développent peu (Graveland *et al.*, 1985). Actuellement, l'importance de l'O<sub>2</sub> est de plus en plus considérée (Eyoun *et al.*, 2003 ; Dobraszczyk, 2005).

## **2.4 Interactions biochimiques au sein de la pâte**

Lors de la formation de la pâte, l'hydratation des molécules composant la farine permet l'établissement de nombreuses interactions entre ces dernières telles que des liaisons hydrogène, ioniques, hydrophobes et covalentes. Lors du pétrissage, l'ensemble de ces interactions sont susceptibles d'être remaniées du fait des contraintes mécaniques et de la présence d'autres ingrédients dans la formulation des pâtes (levure, NaCl, agents d'oxydoréduction, auxiliaires de fabrication, *etc.*).



### **2.4.1 Développement du réseau protéique de gluten – échanges thiols (SH) / disulfures (SS)**

Lors du pétrissage, le réseau protéique se développe sous l'effet notamment de réactions d'échange SH / SS impliquant l'ensemble des composés porteurs de groupement SH (figure 30). Différents modèles ont été proposés pour expliquer les interactions entre les gluténines SG-HPM et SG-FPM (Khan et Bushuk, 1979 ; Graveland *et al.*, 1985 ; Kasarda, 1989 ; Gao et Bushuk, 1992 ; Hamer et Van Vliet, 2000 ; Belton, 2005). Aucun consensus n'est trouvé, mais tous ces auteurs s'accordent sur la présence de ponts disulfures inter et intra moléculaires et d'interactions hydrophobes au sein du réseau de gluten. Par ailleurs, Tilley *et al.* (2001) ont émis des hypothèses sur le rôle des dimères de tyrosine dans la formation du réseau de gluten. Hanft et Koehler (2005) ont quantifié par HPLC couplée à la spectrométrie de masse les teneurs en résidus dityrosine dans la farine et ceux formés lors du pétrissage. Au vu des quantités de dityrosine formées pendant le pétrissage, ces auteurs indiquent qu'il est peu probable qu'elles jouent un rôle important dans la formation du réseau de gluten. Ces mêmes auteurs observent également une formation accrue de dityrosine lors d'un pétrissage en présence d'une quantité importante de glucose oxydase avec un ajout simultané de glucose. Des résultats similaires ont été obtenus par Rodriguez-Mateos *et al.* (2006), qui confirment leurs hypothèses.

En présence d'oxygène (Graveland *et al.*, 1985), le pétrissage provoque l'augmentation de l'extractibilité des protéines de haut poids moléculaires (Weegels *et al.*, 1996 ; Surel *et al.*, 2006) attribuée à la dépolymérisation du réseau protéique. Ces réactions conduisent à une modification de la composition des macropolymères gluténiques (insolubles au SDS) et lors du repos consécutif au pétrissage, des réactions de repolymérisation modifient les structures (Weegels *et al.*, 1997). Lindsay et Skerrit (1998) ont montré par une analyse par microscopie que les SG-HPM forment des chaînes et des réseaux alors que les SG-FPM forment des petits groupes et des agrégats.

### **2.4.2 Interactions pentosanes-protéines**

Labat *et al.* (2001) ont suggéré que les pentosanes solubles, en formant un réseau, limiteraient le mouvement des gluténines et la formation de plus gros agrégats. Les travaux de Carvajal-Millan *et al.* (2005b) confirment que le coefficient de diffusion apparent des

Tableau 5. Ensemble des systèmes impliqués dans les réactions d'oxydoréductions des pâtes (Potus *et al.*, 1999).

| Enzyme  | Réactions catalysées   |
|---|--|
| Acide linoléique : oxygène oxydoréductase ou <b>lipoxygénase (LOX)</b><br>EC 1.13.11.12   | Acides gras polyinsaturés + O <sub>2</sub> ↔ hydroperoxydes d'acides gras insaturés  |
| Donneur d'hydrogène : peroxyde d'hydrogène oxydoréductase ou <b>peroxydase (POD)</b><br>EC 1.11.1.7                                       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DH <sub>2</sub> ↔ 2 H <sub>2</sub> O + D<br>et<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 DH ↔ 2 H <sub>2</sub> O + DD |
| Donneur d'hydrogène : peroxyde d'hydrogène oxydoréductase ou <b>catalase (CAT)</b><br>EC 1.11.1.6   | 2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↔ 2 H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>  |
| Monophénol, diphénol : oxygène oxydoréductase ou <b>tyrosinase</b><br>EC 1.14.18.1  | monophénol + 1/2 O <sub>2</sub> ↔ diphénol<br>et<br>diphénol + 1/2 O <sub>2</sub> ↔ quinone + H <sub>2</sub> O                                   |
| Diphénol : oxygène oxydoréductase ou <b>polyphénoloxydase (PPO)</b><br>EC 1.10.3.1 ( <b>catécholase</b> )/ EC 1.10.3.2 ( <b>laccase</b> ) | diphénol + 1/2 O <sub>2</sub> ↔ quinone + H <sub>2</sub> O   |
| L-ascorbique : oxygène oxydoréductase ou <b>acide ascorbique oxydase</b><br>EC 1.10.3.3   | acide L-ascorbique + 1/2 O <sub>2</sub> ↔ acide L-déhydroascorbique + H <sub>2</sub> O   |
| Glutathion : acide déhydroascorbique réductase ou <b>glutathione déhydrogénase</b><br>EC 1.8.5.1  | 2 GSH + acide L-déhydroascorbique ↔ GSSG + acide L-ascorbique  |
| β-glucose : oxygène oxydoréductase ou <b>glucose oxydase (GOX)</b><br>EC 1.1.3.4  | β-D-glucose + O <sub>2</sub> ↔ D-gluconolactone + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  |
| Thiol : oxygène oxydoréductase ou <b>sulfhydryle oxydase (SOX)</b><br>EC 1.8.3.7  | 2 PSH + O <sub>2</sub> ↔ PSSP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  |
| Superoxyde : superoxyde oxydoréductase ou <b>superoxyde dismutase (SOD)</b><br>EC 1.15.1.1  | 2 O <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup> ↔ O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  |
| glutathion : protéine disulfure oxydoréductase<br>EC 1.8.4.2  | 2 GSH + PSSP ↔ GSSG + 2 PSH  |

protéines absorbées sur des gels d'arabinoxylanes solubles décroît lorsque le degré de réticulation et la concentration en arabinoxylanes du gel augmentent.

D'après Wang *et al.* (2002), les pentosanes solubles, par l'intermédiaire des arabinoxylanes liées aux acides féruliques, sont impliqués directement dans la formation du gluten. Le mode d'action des arabinoxylanes liées aux acides féruliques pourrait être de deux types. Premièrement, la réticulation des pentosanes solubles conduit à l'augmentation de la viscosité de la phase liquide. La viscosité est en général un facteur limitant le taux d'agrégation et donc la formation du gluten (Wang *et al.*, 2004). Deuxièmement, des réactions faisant intervenir l'AF favoriseraient l'agrégation du gluten. Ces auteurs proposent l'existence d'une éventuelle liaison (non démontrée) entre les arabinoxylanes et les protéines du gluten. En présence de laccase, Labat *et al.* (2000a) ont montré que l'acide férulique libre ajouté dans la pâte accentue l'affaiblissement de la pâte pendant le pétrissage (mesuré par le couple au niveau du bras du pétrin), cet affaiblissement étant attribué à une dépolymérisation des protéines de haut poids moléculaires (chutes du rapport SG-HPM/SG-FPM). Ces contradictions suggèrent que les interactions entre le réseau des pentosanes et du gluten sont de plusieurs ordres, physique, compétition sur l'eau et chimique. Le rôle médiateur de l'AF peut expliquer les interactions par des échanges oxydoréducteurs entre les deux réseaux, pouvant conduire à une amélioration de la réticulation ou de l'agrégation de celui-ci, ou quand il est présent en forte dose une dégradation des polymères.

### **2.4.3 Réactions enzymatiques intervenant lors du pétrissage.**

#### **2.4.3.1 Réactions d'oxydoréduction**

Les réactions d'oxydoréduction se produisant en panification sont multiples et complexes (tableau 5). Elles font intervenir un certain nombre de systèmes oxydoréductase-substrats redox (Nicolas *et al.*, 2007). Dans ce chapitre, les systèmes étudiés lors de la thèse sont détaillés, les autres simplement mentionnés. A chaque fois, leur rôle technologique est précisé.

##### **2.4.3.1.1 Système LOX-PUFA**

La lipoxygénase (linoléate:oxygène oxydoréductase, EC 1.13.11.12) est une enzyme à fer qui catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) contenant le motif cis-cis-1,4- pentadiène. Dans la farine, ce sont principalement les acides linoléique (C<sub>18:2</sub>) et  $\alpha$

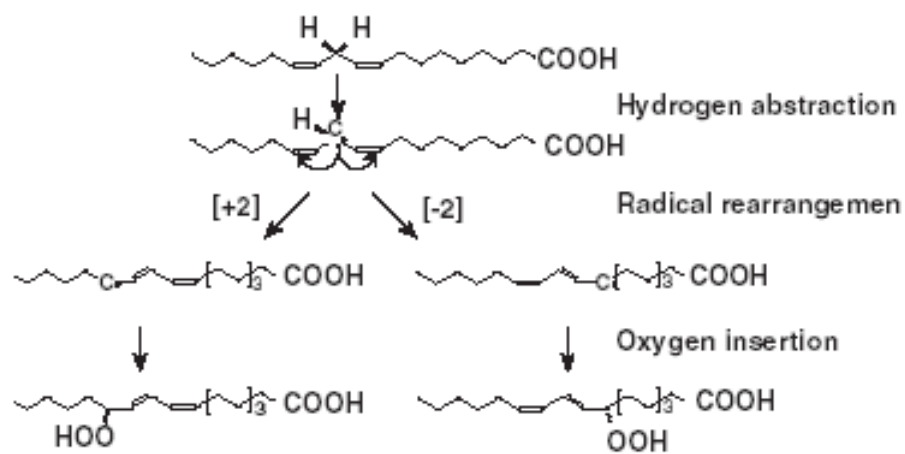


Figure 31. Mécanisme d'oxydation catalysée par la LOX (EC 1.13.11.12), d'après Liavonchanka et Feussner (2006).

linoléique (C<sub>18:3</sub>), à l'état libre ou estérifiés sous forme de monoacylglycérol pour ce qui concerne la LOX de blé.

### 2.4.3.1.1.1 Activité LOX des farines

Dans la farine de blé, des études récentes rapportent des activités LOX comprises entre 20 et 100 nkat.g<sup>-1</sup> ms (Eyoum *et al.*, 2003 ; Leenhardt *et al.*, 2006a ; Levavasseur *et al.*, 2006) pour des farines de diverses origines. La farine de fève ou de soja ont des activités LOX nettement supérieures et des spécificités différentes à celles trouvées dans la farine. Every *et al.* (2006) ont étudié la distribution de l'activité LOX dans les fractions meunières et observé que 50 à 65 % de l'activité provient du germe. Ces résultats sont relatifs, la teneur en LOX étant dépendante de la variété de blé, ainsi que du procédé de mouture (taux d'extraction de la farine, notamment). Bien que les diagrammes de moutures ne soient pas comparables, les résultats de Every *et al.* (2006) sont en accord avec ceux de Rani *et al.* (2001) à savoir que la fraction contenant les sons est plus riche en activité LOX que les autres fractions meunières.

### 2.4.3.1.1.2 Réactions catalysées

Le mécanisme d'oxydation débute par la transformation d'1 mole de PUFA en intermédiaires radicalaires stabilisés par des réarrangement intra-moléculaires, puis une mole d'O<sub>2</sub> est insérée pour former un hydroperoxyde (produit primaire de la réaction) (figure 31, Liavonchanka et Feussner, 2006). Au sein de la pâte, Dolev *et al.* (1967, cités par Nicolas et Drapron, 1981) ont montré que l'oxygène incorporé dans la molécule d'hydroperoxyde formé provenait exclusivement des molécules d'oxygène dissous dans la phase aqueuse en utilisant de l'O<sub>2</sub> marqué (O<sup>18</sup>). La plupart de l'O<sub>2</sub> consommé par la pâte lors du pétrissage peut être attribué à l'oxydation des PUFA par la LOX (Smith et Andrews, 1957 ; Eyoum, 2002 ; Levavasseur *et al.*, 2006).

### 2.4.3.1.1.3 Effets de la lipoxygénase en panification

Pendant le pétrissage, la LOX a de nombreuses fonctions : oxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA), blanchiment de la pâte, libération de lipides, amélioration de la tolérance au surpétrissage, du temps de relaxation et du volume du pain.

Bien que d'autres enzymes présentes dans la farine de blé tendre, telles que la peroxydase (POD) ou la polyphénol oxidase (PPO), participent au blanchiment des pâtes, il apparaît que la LOX joue un rôle majeur dans ce phénomène



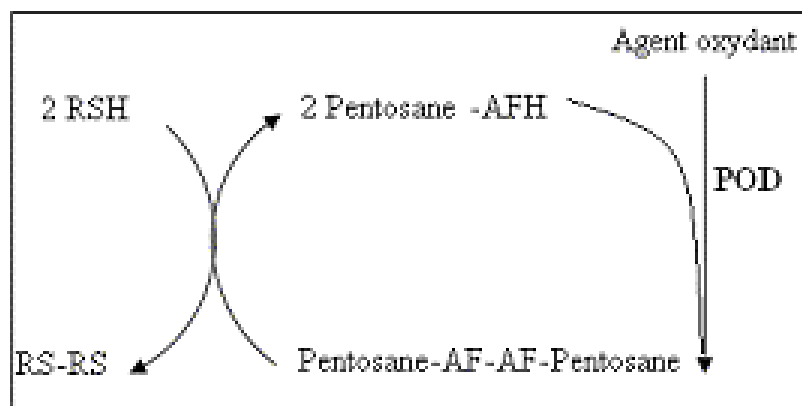


Figure 32. Hypothèse sur les échanges thiols/disulfures engendrés par l'action de la peroxydase sur les pentosanes (d'après Garcia, 2000)

(Nicolas, 1978 ; Nicolas et Drapron, 1983). L'ajout de lipoxygénase de fève ou de soja sous forme de farine est couramment répandu pour blanchir la pâte.

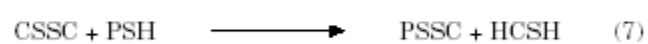
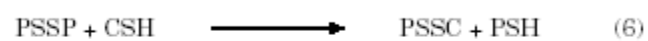
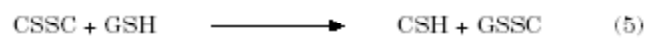
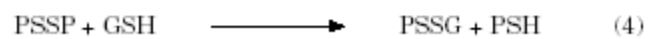
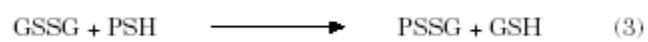
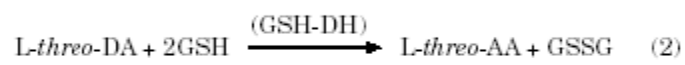
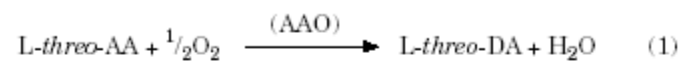
D'un point de vue nutritionnel, l'oxydation des PUFA et la co-oxydation des pigments caroténoïdes et des tocophérols constituent une diminution en acides gras essentiels et en provitamines A. Leenhardt *et al.* (2006b) suggèrent de choisir des variétés de blé en tenant compte du rapport pigments/activité LOX de façon à limiter la perte nutritionnelle (forte concentration en pigments pour une faible activité LOX). Ces auteurs proposent également la réduction du temps de pétrissage et des périodes de fermentations plus longues pour limiter l'incorporation d'O<sub>2</sub> dans les pâtes et préserver les capacités antioxydantes des pigments caroténoïdes et des tocophérols également.

Bien qu'il n'ait jamais été clairement démontré, l'effet améliorant sur les propriétés rhéologiques de la pâte de la LOX est probablement dû à des mécanismes de co-oxydation des groupements thiols accessibles des protéines du gluten (Grosch, 1986). Au cours du pétrissage, des complexes lipides-protéines sont formés sous l'action de la lipoxygénase (Potus et Drapron, 1991), lors des réactions d'oxydation des PUFA. Les qualités plastiques du gluten sont alors renforcées et la pâte est plus tolérante au surpétrissage (Hoseney *et al.*, 1980).

Enfin, au sein de la pâte, un certain nombre de composés sont inhibiteurs de l'activité LOX, le NaCl, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'AF et un polypeptide (Nicolas, 1978).

### 2.4.3.1.2 Système POD-AF

Les peroxydases (POD, EC 1.11.1.7) oxydent les composés phénoliques de la pâte en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La présence de peroxyde d'hydrogène reste le facteur limitant l'expression de cette activité (Nicolas *et al.*, 1993 ; Nicolas et Potus, 1994). Sur le plan technologique, elle renforce la cohésion des gels protéiques ou glucidiques. En oxydant l'acide férulique (formation de radicaux libres), elle est capable de polymériser les protéines par formation de ponts disulfures (figure 32) ; mais elle réalise aussi des pontages phénolique entre tyrosine en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Matheis et Whitaker, 1984). La POD, en présence d'un donneur d'oxygène, polymérise aussi les pentosanes solubles en pentosanes-pentosanes par pontage phénolique entre deux résidus d'acide férulique (Neukom et Markwalder, 1978). Une polymérisation pourrait aussi se faire par pontage covalent entre un groupement thiol d'une cystéine protéique et un acide férulique au niveau de sa double liaison activée (Hoseney et Faubion, 1981).



PSSP: gluten proteins

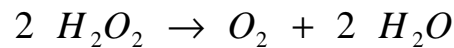
Figure 33. Mécanisme proposé par Grosch et Wieser (1999) pour expliquer l'effet améliorant du L-thréo-AA dans la pâte

La peroxydase oxyde également, grâce à son groupement hème, en présence d'oxygène, les acides gras insaturés et détruit, par conséquent, les pigments caroténoïdes. En présence de glucose oxydase (voire de hexose oxydase), la POD est activée par la fourniture de peroxyde d'hydrogène (Garcia *et al.*, 2004).

#### **2.4.3.1.3 Système CAT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Peu d'études ont été consacrées aux effets de la catalase ( EC 1.11.1.6) en panification. Quelques auteurs lui attribuent un effet améliorant sur les propriétés rhéologiques (Irvine *et al.*, 1954), ainsi qu'un accroissement du blanchiment des pâtes (Hawthorn et Todd, 1955).

La catalase entraîne la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau :

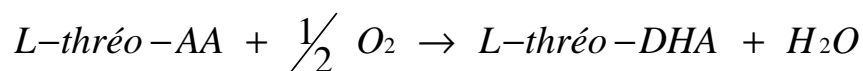


Le fonctionnement de cette enzyme dans la pâte nécessite la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce dernier n'a jamais été clairement identifié dans la pâte. Bien que l'activité catalasique dans la farine et dans la pâte soit de plusieurs  $\mu\text{kat.g}^{-1} \text{ms}$  (Eyoum *et al.*, 2003), les constantes cinétiques des isoformes de l'enzyme (Garcia *et al.*, 2000) et la dénaturation partielle irréversible de celles-ci lorsque le pH devient acide (Delcros *et al.*, 1998) suggèrent que lors du pétrissage, cette enzyme se trouve dans des conditions peu favorables pour la manifestation de son activité.

#### **2.4.3.1.4 Système acide ascorbique oxydase/acide ascorbique**

##### 2.4.3.1.4.1 Réactions catalysées

En présence d'O<sub>2</sub>, l'acide ascorbique oxydase (EC 1.10.3.3) est une enzyme à cuivre qui catalyse l'oxydation de l'acide *L-thréo*-ascorbique (*L-thréo*-AA) en acide déhydroascorbique (*L-thréo*-DHA) :



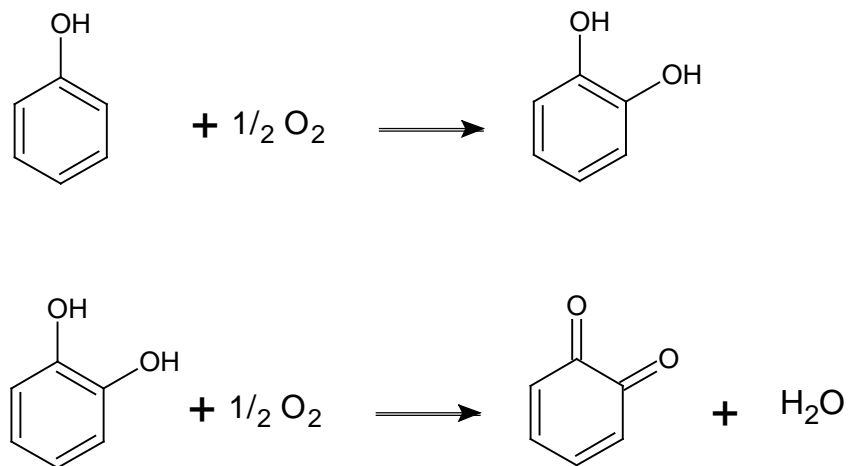


Figure 34. Réactions catalysées par les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1). Oxydations des monophénols et des *o*-diphénols

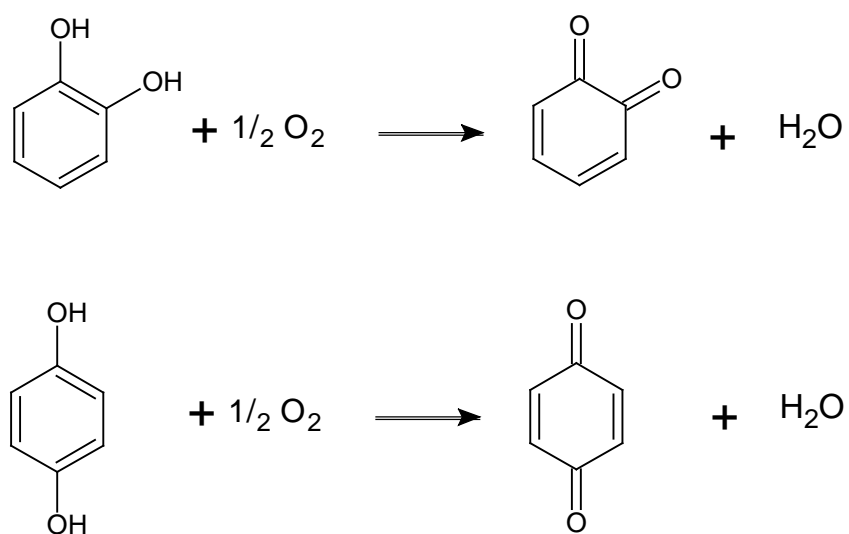


Figure 35. Réactions catalysées par les laccases (EC 1.10.3.2). Oxydation des *o*-diphénols et des *p*-diphénols.

L'acide ascorbique (réducteur) est universellement utilisé en panification (Grosch, 1986 ; Grosch et Wieser, 1999), mais dans la pâte, son effet améliorant est dû à sa transformation rapide en acide déhydroascorbique. Selon les pâtes fabriquées, les doses utilisées sont variables et de l'ordre de quelques dizaines de mg pour 1 kg de farine.

### 2.4.3.1.4.2 Mécanismes d'action au sein de la pâte

Grosch et Wieser (1999) ont proposé un mécanisme pour expliquer l'effet améliorant de l'acide ascorbique, faisant intervenir le système acide ascorbique oxydase (AAO) et le système glutathion-DHA oxydoréductase (GSH-DH, figure 33). Durant le pétrissage, le L-*Thréo*-AA est oxydé en L-*Thréo*-DHA (étape 1), ce dernier oxyde le glutathion (GSH) en dimères (GSSG) par l'intervention du système glutathion-déhydroascorbate oxydoréductase, GSH-DH (étape 2). Cette étape a pour conséquence de bloquer les fonctions thiols libres du GSH, empêchant de ce fait son effet réducteur, à la fois lorsque le GSH forme des ponts disulfures avec des fonctions thiols libres des protéines (conduisant à une dépolymérisation de celle-ci, étape 4), mais aussi avec la cystéine (CSH) sous forme de cystine (étape 5). La CSH libérée est alors capable de dépolymériser les protéines du gluten (étape 6) par des échanges SH/ S-S. Ainsi, l'oxydation rapide du GSH en GSSG améliore la force de la pâte en diminuant les échanges SH/SS entre les protéines et les thiols de bas poids moléculaires. Ce mécanisme montre que le L-*thréo*-AA oxydé est régénéré, ce qui explique l'efficacité de faibles doses d'AA. Par ailleurs, il semble que cet effet améliorant soit dû également à l'oxydation du L-*thréo*-AA par d'autres systèmes (Grant, 1974).

### 2.4.3.1.5 Système polyphénoloxydase (PPO)/phénols

Les polyphénols oxydases (PPO) sont des oxydoréductases capables de provoquer la polymérisation oxydative des phénols en présence d'oxygène (brunissement enzymatique des fruits et légumes, Nicolas *et al.*, 2003). Le terme PPO est générique et regroupe un ensemble d'activité phénolase, crésolase, tyrosinase, catécholase, diphénolase, laccase, *etc* (Nicolas *et al.*, 2007).

Les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1) forment un premier sous-groupe d'enzymes qui catalysent en présence d'O<sub>2</sub> deux types de réactions : l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols, et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones (figure 34). Le mécanisme réactionnel est séquentiel ordonné impliquant le transfert de 2 électrons à chaque étape. Les tyrosinases appartiennent à cette classe d'enzymes.



Les laccases (EC 1.10.3.2) forment le second sous-groupe. Elles oxydent les o-diphénols, p-diphénols et certains monophénols en quinones correspondantes avec la formation intermédiaires de semiquinones radicalaires (figure 35). Le mécanisme réactionnel est de type Ping-Pong, impliquant le transfert d'un seul électron à chaque étape.

Dans la farine, l'activité PPO endogène est de type catéchol oxydase. Elle est faible comparée aux autres oxydoréductases (Zawitowski *et al.*, 1991). De plus, une part de ces enzymes n'est pas soluble rendant difficile l'extraction de l'activité pour la mesurer de façon optimale (Fuerst *et al.*, 2006). L'activité PPO est principalement concentrée dans les sons (Rani *et al.*, 2001 ; Every *et al.*, 2006). Du point de vue technologique, seul un effet est constaté sur la couleur du produit final dans la fabrication des pâtes alimentaires (Feillet *et al.*, 2000).

L'ajout d'activité PPO exogène dans la pâte peut provoquer la polymérisation des phénols entraînant des modifications sur les propriétés rhéologiques (Neukom et Markwalder, 1978 ; Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998c et 1999a ; Figueroa-Espinoza et Rouau, 1999 ; Labat *et al.*, 2001 ; Primo-Martin *et al.*, 2003 ; Hanft et Koehler, 2005). Ces aspects seront détaillés dans le chapitre consacré aux laccases. Par ailleurs, Kuninori *et al.* (1976) ont montré que l'oxydation des résidus de tyrosine par la tyrosinase de champignon (*mushroom tyrosinase*) avaient un impact sur les propriétés rhéologiques, notamment par la formation de liaisons covalentes avec les résidus cystéine (Takasaki et Kawakishi, 1997).

### **2.4.3.2 Réactions d'hydrolyse**

Dans la farine et la levure, les principales hydrolases sont :

- Les protéases : Elles assouplissent le gluten et augmentent la vitesse d'adsorption d'eau. Elles modifient l'arôme du pain par formation de composés volatils issus du catabolisme protéique et de la réaction de Maillard et favorisent la coloration de la croûte (Potus *et al.*, 1996).

- Les lipases (EC 3.1.1.3) : En hydrolysant les esters d'acide gras, elle stabilise les couches lipidiques interfaciales. Elles modifient l'arôme du pain par formation de composés volatils issus de l'oxydation des acides gras non estérifiés (Potus *et al.*, 1996) ;

- Les alpha et bêta amylases : L' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) est une endoamylase qui hydrolyse l'amidon en oligosides linéaires et branchés dont le maltose et les  $\alpha$ -dextrines (produits principaux) ;



**Tableau 6. Principaux améliorants utilisés en panification et leurs effets.**

|  | Dose autorisée | Effet(s) biochimique(s)  | Effet(s) technologique(s)  |
|--|----------------|--|--|
| <b>Les oxydants</b>                                    |                |  |  |
| Acide ascorbique                                       | NL             | oxydation du thiols hydrosolubles (1,2)<br>Effet antioxydant (3,4)<br>Inhibition de la LOX | Améliore la consistance de la pâte<br>Augmente le volume du pain |
| farine de fève   | 2 %            | Apport d'activité LOX, de lipides (notamment oxydables) (5)                                | Blanchiment (pâte, mie)  |
| farine de soja   | 0,5 %          | Apport d'activité LOX, oxydation des PUFA des fractions TAG                                | Blanchiment, souplesse améliorée de la mie                       |
| Glucose oxydase  |                | Active le système POD (6)  | Augmente la consistance et la stabilité de la pâte               |
| Oxydants chimiques (bromate, iodate, azodicarbonamide) | X              | Oxydation des thiols hydrosolubles (7,8)   | Améliorent la rétention gazeuse                                  |
| <b>Les hydrolases</b>                                  |                |  |  |
| farine de malt   | 0,3 %          | Apport d'enzymes (amylase)   | Active la fermentation   |
| Amylases   | NL             |  | Active la fermentation   |
| Hémicellulase, pentosanase, glucanase, xylanase        | NL             | Dépolymérisation des chaînes polyosidiques, baisse de la viscosité                         | Améliore la machinabilité  |
| Lipases  | 0,3 %          | Hydrolyse des lipides, stabilisation des interfaces  | Diminue le cloquage, alvéolage plus régulier                     |
| <b>Les réducteurs</b>                                  |                |  |  |
| Cystéine, Glutathion                                   | X              | Echanges SH/SS   |  |
| Levures désactivées                                    |                | source de glutathion, échanges SH/SS   | Augmente l'extensibilité, baisse de la ténacité                  |
| <b>Les émulsifiants</b>                                |                |  |  |
| Lécithine de soja                                      | 0,3 %          | Apport de lipides polaires   | Augmente le volume   |
| Les DATEM  | 0,2 %          |  |  |
| <b>Divers</b>  |                |  |  |
| gluten de blé  | NL             |  | augmente la ténacité de la pâte                                  |

1, Grosch et Wieser, 1999 ; 2, Ameille, 1998 ; 3, Buettner, 1993 ; 4, Pastore et al., 2000 ; 5, Nicolas, 1978 ; 6, Garcia, 2000 ; 7, Louarme, 2001 ; 8, Dupuis, 1997 ;

NL : dose non limitée

La  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2) est une exoamylase qui hydrolyse l'amidon, au niveau des extrémités non réductrices, en  $\beta$ -maltoses et en  $\beta$ -dextrines de haut poids moléculaire (produits principaux).

Les amylases bactériennes ont un effet antirassissant, elles favorisent le dégagement gazeux au cours de la fermentation et sont susceptibles de diminuer la rétention gazeuse au cours de la cuisson. Elles participent aussi à la modification de l'arôme du pain par formation de composés volatils issus des fermentations secondaires, des réactions de Maillard et de caramélisation et favorisent la coloration de la croûte (Potus *et al.*, 1996).

La maltase (E.C. 3.2.1.20) : hydrolyse le maltose produit par les amylases en glucose pour qu'il soit utilisé par la levure.

### **2.4.4 Effets des améliorants lors du pétrissage**

Dans le domaine agroalimentaire, l'ajout d'améliorants est soumis à la législation. En panification, les additifs sont ajoutés à la pâte et sont présents dans le produit fini. A la différence de ces derniers, les auxiliaires technologiques sont présents dans le procédé, mais absents du produit fini, de telle sorte qu'ils ne sont pas soumis à l'étiquetage. C'est le cas des enzymes, dénaturées lors de la cuisson du pain. Le plus souvent, les améliorants sont ajoutés soit sous forme de cocktail (enzymes seules ou en association) ou de mix prêt-à-l'emploi. Par ailleurs, des adjuvants (améliorants naturels) sont couramment utilisés.

Outre la farine, l'eau, le sel et la levure, la plupart des pâtes contiennent des améliorants, d'une part pour compenser les irrégularités et variations des qualités boulangères des farines, d'autre part, pour améliorer l'aspect visuel du pain (volume, couleur, texture, conservation). Pris séparément, on peut les regrouper en différentes classes :

- les agents oxydants pour améliorer la consistance, l'élasticité, la formation des réseaux ;
- les réducteurs pour augmenter l'extensibilité des pâtes ;
- les émulsifiants pour stabiliser les interfaces (eau-lipides-protéines, interface pâte-gaz ;
- les fractions de farines pour améliorer certaines fonctionnalités des farines.

Le tableau 6 présente les principaux améliorants utilisés ayant des effets biochimiques et technologiques.

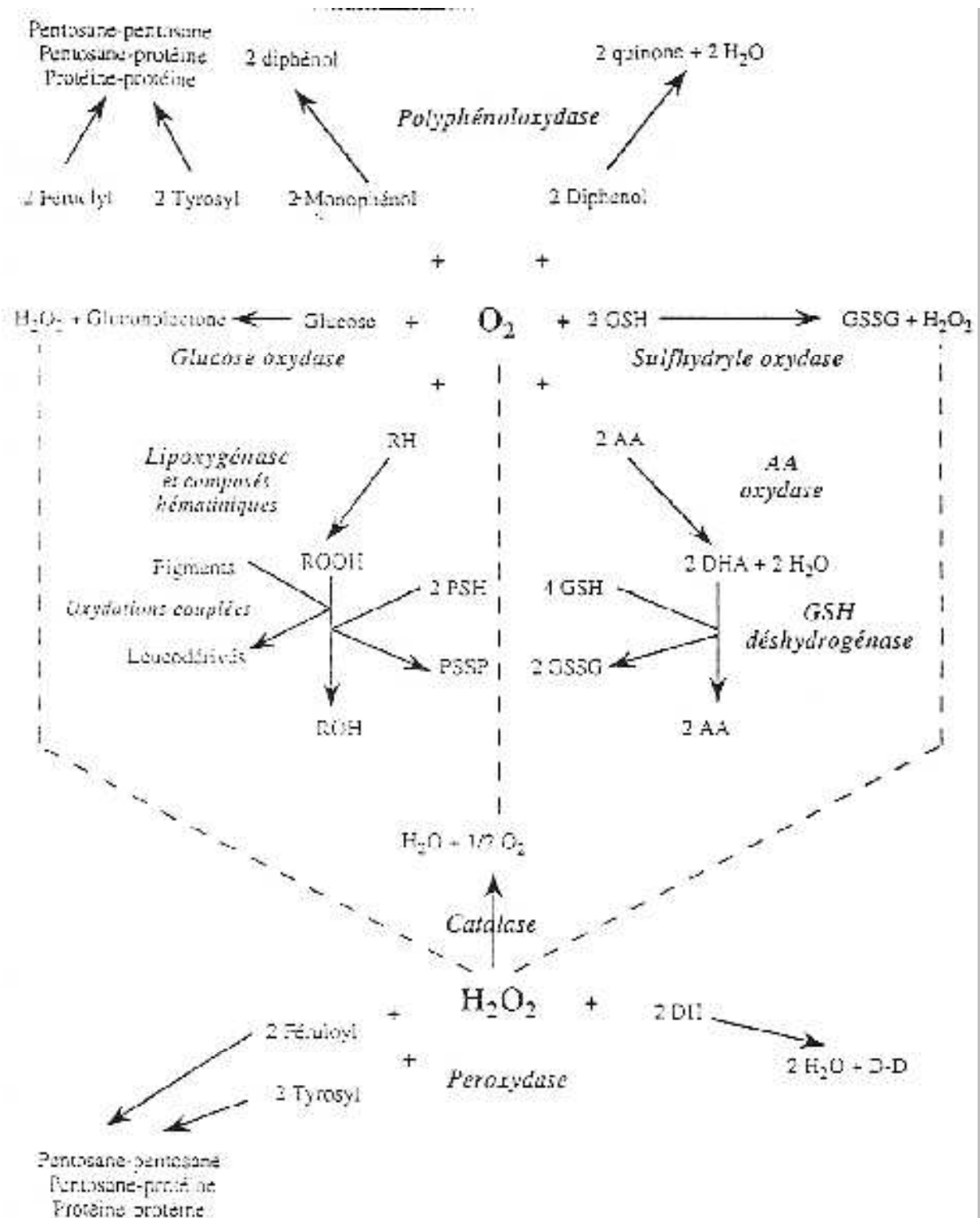


Figure 36. Ensemble des réactions d'oxydoréductions faisant intervenir l'oxygène dans la pâte de farine de blé tendre (d'après Potus, 1997).

## **2.5 Importance de l'aération et de l'oxygénation de la pâte lors du pétrissage**

La structure aérée de la pâte est rendue possible par les caractéristiques uniques des protéines du gluten, capables de constituer les alvéoles gazeux pour retenir les gaz de fermentation

### **2.5.1 Aération des pâtes pendant le pétrissage**

Les premiers travaux réalisés sur l'aération des pâtes datent des années 1940. Dans cette période, Baker et Mize (1946) démontrent que les gaz sont progressivement occlus dans la pâte pendant le pétrissage. Ils décrivent que l'incorporation des gaz au sein de la pâte et la vitesse d'incorporation sont maximales lorsque le gluten est à son optimum de développement. Junge *et al.* (1981) décrivent les mêmes phénomènes pour des pâtes supplémentées avec des surfactants. Récemment, Campbell *et al.* (1998) ont étudié les mécanismes de l'aération des pâtes et de la répartition des *nuclei* et de leur taille au sein de la pâte. L'effet de la pression (surpression ou dépression) est également discuté (Campbell *et al.*, 2001), une surpression ayant un effet bénéfique sur l'incorporation de *nuclei* gazeux (pâte plus aérée, densité plus faible).

### **2.5.2 Que représente et traduit la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte ?**

La première mesure de la consommation d'O<sub>2</sub> par une pâte de farine – eau – chlorure de sodium est rapportée par Smith et Andrews (1957). Depuis, peu d'articles sont consacrés à sa mesure lors du pétrissage, exceptés les travaux réalisés à la chaire de biochimie industrielle et agroalimentaire du Cnam (Ameille *et al.*, 2000b ; Celhay, 2000 ; Eyoum *et al.*, 2003). Quelques remarques peuvent être cependant faites.

La première remarque est que l'oxygène est hydrophobe, en revanche, son utilisation par les systèmes enzymatiques nécessite qu'il soit dissous dans la phase aqueuse de la pâte (solubilité = 0,225 μM à 25 °C).



La seconde remarque concerne son rôle central dans les réactions d'oxydation enzymatiques intervenant au cours du pétrissage (figure 36). Etant le co-substrat de nombreuses réactions, la compétition pour l'oxygène est importante, d'autant plus que l'efficacité des ajouts de nombreux ingrédients est liée à sa consommation pendant le pétrissage (acide ascorbique, glucose oxydase par exemple). De plus, l'oxygène est également consommé par la levure (*S.cerevisiae*) lorsque celle-ci est présente dans la pâte (Celhay, 2000).

Par ailleurs, l'oxygène est nécessaire au développement du réseau protéique, puisque lorsque le pétrissage est réalisé dans une atmosphère pauvre en O<sub>2</sub>, le réseau de gluten se développe peu (Graveland *et al.*, 1985). De plus, quand les systèmes enzymatiques sont dénaturés par étuvage, pas ou très peu de consommation d'O<sub>2</sub> est mesurée. De même, quand la teneur en acide gras polyinsaturés est très faible, la consommation d'O<sub>2</sub> l'est aussi (Eyoum *et al.*, 2003). Ces remarques illustrent le fait qu'en absence d'additifs, la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte est réalisée principalement par les systèmes enzymatiques endogènes. Eyoum *et al.* (2003) attribuent jusqu'à 70 % de la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte par l'oxydation des acides gras polyinsaturés catalysée par la LOX. Le reste de la consommation peut être d'origine chimique, ou faire intervenir d'autres systèmes redox endogènes, ces derniers étant nombreux dans la farine.

Par ailleurs, Campbell *et al.* (1998) ont travaillé sur les processus d'aération des pâtes au cours du pétrissage, montrant un effet de la pression sur l'incorporation de *nuclei* gazeux à l'origine des alvéoles dans le produit final. Si l'incorporation d'air semble importante pour l'initiation de la formation des alvéoles, en apportant l'air, l'oxygène l'est aussi. Dans un premier temps, nous restreindrons le système enzymatique endogène à l'enzyme, son substrat redox et le co-substrat oxydant qui est l'O<sub>2</sub>.

Si on décompose le phénomène de consommation d'O<sub>2</sub>, la première étape est l'apport de la molécule d'O<sub>2</sub> à proximité de la pâte. Une pâte formée mais sous pétrie développe peu son réseau de gluten, et oxyde peu les acides gras polyinsaturés. Ainsi un des rôles du pétrissage est le brassage de l'atmosphère gazeuse pour le renouvellement de molécules d'O<sub>2</sub> à proximité de la pâte. Ceci indique que la forme des bras, la géométrie de la cuve du pétrin et la vitesse de pétrissage doivent jouer un rôle important. On peut aussi admettre que plus la surface d'échange est grande plus l'apport d'O<sub>2</sub> est grand. Ceci souligne l'importance de l'étirement et de la compression exercés par les bras lors du pétrissage qui va étirer les structures de macromolécules et par la même augmenter la surface d'échange.



De plus, la compression de la pâte peut engendrer une inclusion de bulles de gaz, et une réduction de leur taille (augmentant du même coup la surface d'échanges) par les forces de compression.

En second lieu, une fois l'oxygène apporté près de la pâte, la réaction d'oxydation enzymatique n'est possible que si l' $O_2$  est dissous dans la phase aqueuse condensée de la pâte faisant intervenir les phénomènes de diffusion d' $O_2$ . La faible solubilité de l' $O_2$  pourrait être limitante. En effet, la quantité d' $O_2$  dissoute dans la phase aqueuse est probablement rapidement consommée lors de la formation de la pâte. Par suite, l' $O_2$  devient un facteur limitant pour la réaction enzymatique dans les premiers instants du pétrissage. Puis, lorsque la pâte est pétrie, on peut imaginer que l'apport d' $O_2$  aux systèmes enzymatiques est à un état d'équilibre (apport constant d' $O_2$ ), la quantité d' $O_2$  disponible étant probablement limitée par la diffusion de l' $O_2$  dans la pâte (le coefficient de diffusion dépend de la température, de la composition du milieu et de la pression partielle en  $O_2$ ) et la vitesse de rotation du bras si celle-ci est insuffisante (convection).

En troisième lieu, une fois dissous, l' $O_2$  peut être utilisé par les enzymes. La cinétique de réaction dépend alors des activités enzymatiques présentes dans la pâte à l'instant  $t$ , de la concentration en substrats redox mais aussi probablement de la présence d'inhibiteurs, et de compétiteurs vis-à-vis de l'oxygène (figure 36).

## 2.6 Les laccases, un améliorant potentiellement intéressant en panification

Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des oxydoréductases de la famille des polyphénoloxydases, un ensemble d'enzymes impliqués notamment dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes (Nicolas *et al.*, 2003).

L'oxydation enzymatique des composés phénoliques nécessite la présence simultanée de trois facteurs : l'oxygène, le composé phénolique et l'enzyme. Les laccases ne sont pas présentes dans la farine et l'activité polyphénoloxydase est de type catéchol oxydase. Les composés phénoliques sont présents dans la farine (voir chapitre 2.3.2.8, les acides phénoliques de la farine) tandis qu'après ajout d'eau le pétrissage apporte de l'oxygène aux systèmes enzymatiques. Cependant, l'activité endogène étant faible, l'ajout de polyphénoloxydase est nécessaire pour observer les effets de ces enzymes au sein de la pâte.



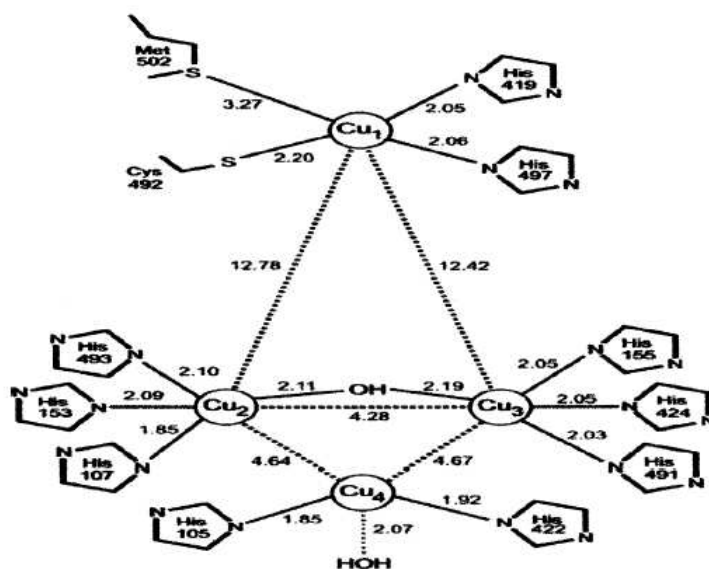


Figure 37. Positionnement des quatre atomes de cuivre dans le site actif de laccase de *B.subtilis* (adapté de Enguita, 2003)

### **2.6.1 Nomenclature et réactions catalysées**

Les laccases, *p*-diphénol oxygène oxydoréductase (EC 1.10.3.2), oxydent un grand nombre de substrats phénoliques (*p*-diphénols en *p*-quinones et les *o*-diphénols en *o*-quinones). Elles peuvent également oxyder des monophénols, des triphénols (figure 35, chapitre le système PPO / phénol). Ce sont des métalloenzymes qui utilisent l'oxygène moléculaire pour oxyder un grand nombre de substrats aromatiques et non aromatiques par un mécanisme réactionnel faisant intervenir des radicaux libres. La présence de plusieurs atomes de cuivre dans leur site actif leur donne leur qualification d'enzymes bleues (*blue copper oxidases*).

### **2.6.2 Origine**

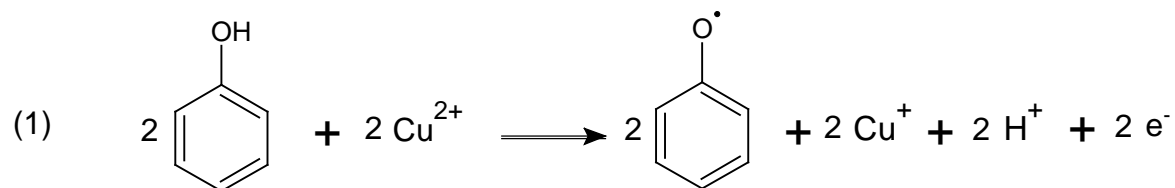
Les laccases sont omniprésentes dans le monde vivant. Elles sont produites essentiellement par de nombreuses moisissures et par quelques tissus végétaux. Une activité laccasique a été détectée chez des insectes et dans une bactérie : *Azospirillum lipoferum*. Ces enzymes sont impliquées dans les mécanismes de biosynthèse et de dégradation de la lignine.

### **2.6.3 Structure moléculaire**

Les laccases selon leur origine diffèrent par leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. En général, les laccases sont monomériques, dimériques ou tétramériques. Ce sont des glycoprotéines dont le taux de glucides se situe entre 10 et 45 %, celui-ci contribuant à la stabilité de l'enzyme. La masse moléculaire de ces enzymes est comprise entre 50 et 100 kDa (Claus, 2004).

#### **2.6.3.1 Site actif des laccases**

Le site actif des laccases est composé de plusieurs atomes de cuivre. Le nombre d'atomes varie selon l'origine de celles-ci, mais en général, 4 atomes sont répartis dans le site actif (figure 37) et selon leur position (Enguita *et al.*, 2003), trois sont responsables de l'activation de l'oxygène (atomes Cu<sub>2</sub>, Cu<sub>3</sub>, Cu<sub>4</sub>) et le dernier (Cu<sub>1</sub>) est responsable de l'oxydation des phénols (Duran et Esposito, 2000).



(2) réduction du cluster trinuécléaire

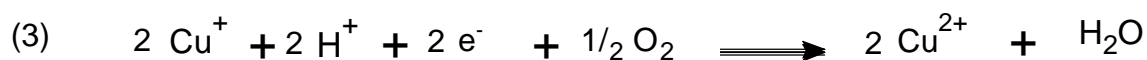
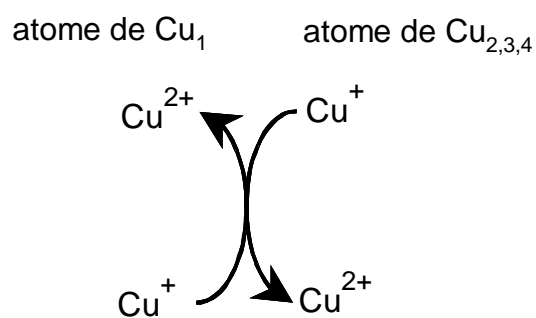


Figure 38. Mécanisme réactionnel des laccases au niveau de leur site actif adapté de Riva, 2006)

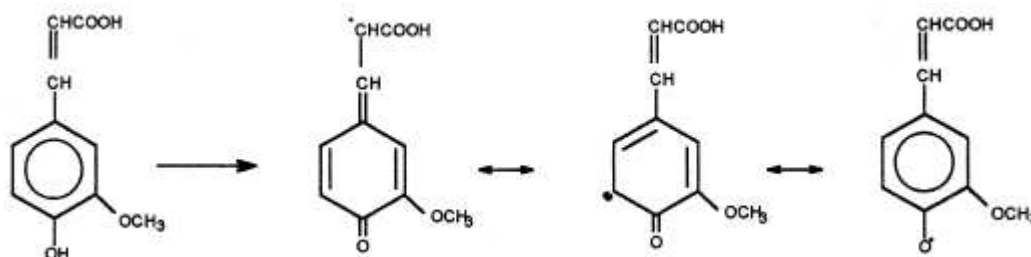


Figure 39. Radicaux féruloyle formés lors de l'oxydation de l'AF (d'après Carunchio *et al.*, 2001).

Lorsqu'elles sont purifiées, les laccases présentent un maximum d'absorbance vers 610 nm (atome de cuivre Cu<sub>1</sub>), qui confère la couleur bleue à la protéine (Claus, 2004) lorsqu'elle est suffisamment concentrée en solution, Cu<sub>2</sub> et Cu<sub>3</sub> étant responsable d'un pic d'absorbance à 330 nm. Les atomes de Cuivre Cu<sub>2</sub>, Cu<sub>3</sub> et Cu<sub>4</sub> forment un « cluster » trinuécléaire, c'est dans ce complexe que la réduction de l'O<sub>2</sub> et la formation d'eau a lieu (Lee *et al.*, 2002 ; Claus, 2004).

### **2.6.3.2 Mécanisme d'oxydation par la laccase**

Lors de l'oxydation des composés phénoliques, l'étape enzymatique génère des radicaux libres qui vont réagir de façon non enzymatique pour former des quinones ou des polymères (mécanisme proposé par Brown en 1967). De plus, la réactivité de ces radicaux (expliquant leur caractère très instable) peut également conduire soit à l'addition de molécules d'eau, soit à des réactions de couplage et de polymérisation, soit à des échanges électroniques lors de réactions d'oxydoréduction avec d'autres composés du milieu. Parfois, ces dernières peuvent provoquer la dépolymérisation de polymères de phénols comme dans le cas de la dégradation des lignines (Claus, 2004).

Au niveau de l'enzyme, le mécanisme est de type « donneur-accepteur » en trois étapes (Gianfreda *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2002 ; Claus, 2004 ; Riva, 2006) :

1. réduction du cuivre (Cu<sub>1</sub>, figure 37) du site actif de l'enzyme (figure 38) ;
2. transfert interne d'électrons au niveau du cluster trinuécléaire d'atomes de cuivre (Cu<sub>2</sub>, Cu<sub>3</sub>, Cu<sub>4</sub>, figure 37) ;
3. réduction de l'oxygène moléculaire.

Lors de l'oxydation des composés phénoliques, 4 électrons sont mis en jeu pour réduire 1 mole d'O<sub>2</sub> en 2 H<sub>2</sub>O. Dans le cas de l'acide férulique libre, les radicaux formés sont stabilisés par la délocalisation électronique (Carunchio *et al.*, 2001, figure 39).

### **2.6.4 Mesure de l'activité laccasique**

L'activité des laccases est mesurée par la vitesse de disparition des substrats (O<sub>2</sub>, phénols) ou par celle d'apparition des produits. Pour ces mesures, il est impératif d'effectuer les mesures en vitesse initiale en raison de l'inactivation possible de l'enzyme au cours de la réaction, de l'éventuelle limitation en substrat (cas des concentrations faibles) mais aussi de sa possible activité vis-à-vis des produits formés.



La mesure polarographique de la consommation d'O<sub>2</sub> constitue une méthode de choix. Le principe de la mesure est basée sur la mesure de la dépolarisation au niveau de la cathode proportionnelle à la quantité d'oxygène dissous. La consommation d'O<sub>2</sub> par voie électrolytique au niveau de l'électrode est négligeable. Les avantages d'une telle méthode sont la simplicité et la rapidité de la mesure. En revanche, les problèmes rencontrés sont le changement du rapport O<sub>2</sub>/substrat oxydé au cours de la réaction et la difficulté de prise en compte de réactions secondaires consommatrices d'O<sub>2</sub> (non enzymatique et enzymatique si les produits de la réactions sont substrats de l'enzyme). Enfin, cette méthode est moins sensible que la méthode spectrophotométrique.

La disparition du substrat phénolique est mesurée par spectrophotométrie. Plus sensible que la polarographie, cette méthode permet la mesure de consommation du substrat phénolique à très faibles concentrations, en revanche, la mesure de l'activité sur des solutions de substrats concentrés est limitée par le domaine de linéarité de l'appareil. De plus, la formation de produits d'oxydation (dimères dans le cas de l'AF) qui ont une absorbance à la longueur d'onde du substrat de départ peut poser des problèmes (Lacki et Duvnjak, 1996). Enfin, le pH peut faire varier les caractéristiques spectrales du substrat et des produits formés, ce qui rend plus difficile les comparaisons des activités enzymatiques à différents pH.

La mesure de la disparition du substrat et celui de l'apparition des produits de la réaction peuvent être aussi réalisés par CLHP. Cette méthode est plus informative puisque dans un premier temps, les molécules du milieu réactionnel (enzyme, substrat et produit) sont séparées permettant de faire un bilan entre les quantités de substrat consommée et celles de produits formés. Il est cependant important de s'assurer de la stabilité du milieu réactionnel après arrêt de la réaction enzymatique en raison de la réactivité des produits formés qui est susceptibles de provoquer des modifications non enzymatiques rapides dans le milieu avant analyse.

Récemment, Mustafa *et al.* (2005) ont utilisé des solvants organiques qui, bien qu'ils diminuent l'activité de la laccase, diminuent aussi la vitesse des réactions non enzymatiques secondaires. L'intérêt pour l'utilisation des laccases en tant que catalyseurs dans des milieux non conventionnels s'est fortement accru ces dernières années (Riva, 2006).

**Tableau 7. Influence de l'origine de la laccase sur la valeur du Km vis-à-vis de plusieurs substrats.**

| <b>Origine</b>                    | <b>2-MOP</b> | <b>2,6-DMOP</b> | <b>AF</b> | <b>ABTS</b> | <b>Syringaldazine</b> |
|-----------------------------------|--------------|-----------------|-----------|-------------|-----------------------|
| <i>Trametes trogii</i>            | 5120         | 410             | 40        | 30          |                       |
| <i>Trametes villosa I</i>         |              |                 |           | 58          | 3,9                   |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> |              |                 |           | 96          | 2,9                   |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>    |              |                 |           | 18          | 4                     |
| <i>Botritis cinerea</i>           |              |                 |           | 28          | 0,8                   |
| <i>Coriolus versicolor</i>        |              | 20,3            |           |             | 2,2                   |
| <i>Panus tigrinus</i>             |              | 16,6            |           |             | 2                     |

### **2.6.5 Spécificité envers le substrat phénolique**

Les laccases sont capables d'agir sur un très grand nombre de composés. La spécificité envers le substrat réducteur varie selon l'origine de l'enzyme, et pour une même laccase, le  $K_m$  change selon le substrat (tableau 7). Elles sont capables de transformer :

- des phénols substitués par  $OCH_3$ ,  $CH_3$ ,  $COOH$  tels que les acides férulique, sinapique, vanillique, vératricque ;
- les polyphénols (par exemple, la lignine) lors de réactions de polymérisation ou de dépolymérisation. Le sens de la réaction dépend du degré de polymérisation du polyphénol ;
- les chloro- ou bromophénols ;
- certains composés non-phénoliques (aniline substituée, polyamines) ;

De plus, les laccases peuvent être utilisées dans un système médiateur. Dans ce cas, elles oxydent le médiateur (ABTS par exemple) puis ce dernier va oxyder des espèces moléculaires moins facilement oxydables par l'enzyme (composés non phénoliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques). Dans ce schéma, l'étape enzymatique (formation du radical actif) est très rapide par rapport aux étapes ultérieures.

La variation de spécificité vis-à-vis des substrats semble liée à leur densité électronique autour de la fonction oxydable. Les substituants électrodonneurs comme  $OH$ ,  $OCH_3$  ou  $NH_2$  facilitent l'oxydation, alors que les groupes électroattracteurs comme  $NO_2$  ou  $COOH$  la freinent.



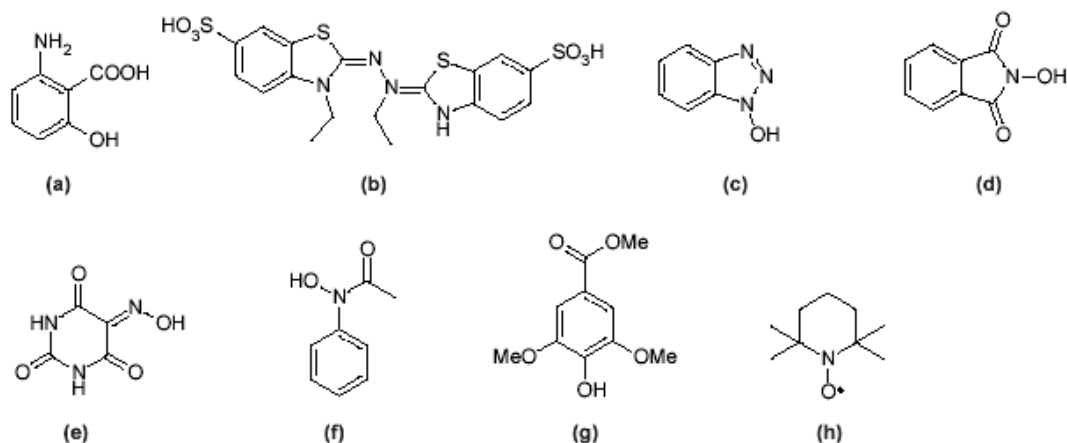
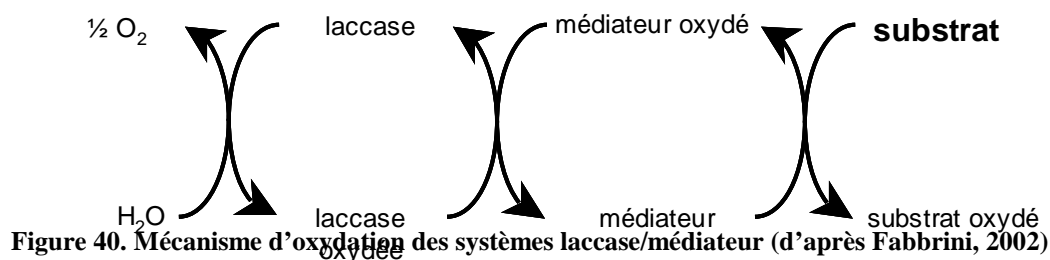


Figure 41. Structure chimique des principaux médiateurs synthétiques. (a) 3-Hydroxyanthranilic acid (HAA); (b) acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS); (c) N-hydroxybenzotriazole (HBT); (d) N-hydroxyphthalimide (HPI); (e) acide violurique (VLA); (f) N-hydroxyacétanilide (NHA); (g) acide syringique ; (h) 2,2,6,6-tetraméthylpiperidine-1-oxyle (TEMPO).

Tableau 8. Influence de l'origine de l'enzyme sur le pH optimum en fonction du substrat.

| Origine                        | Substrat        | pH optimum | référence                      |
|--------------------------------|-----------------|------------|--------------------------------|
| <i>Trametes trogii</i>         | ABTS et 2-MOP   | 3 – 3,5    | Garzillo <i>et al</i> (1998)   |
| <i>Trametes versicolor I</i>   | Acide sinapique | 4          | Lacki <i>et al</i> (1996)      |
|                                | Sinapaldéhyde   | 4,5        |                                |
|                                | Sinapine        | 3,3        |                                |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> | Gaiacol         | 4,4-5      | Schiepake <i>et al.</i> (2000) |
|                                | Syringaldazine  | 4-4,5      |                                |

## **2.6.6 Systèmes médiateurs**

Pour les substrats non phénoliques ou les phénols qui possèdent un potentiel redox élevé, l'ajout d'un médiateur dans le milieu réactionnel permet d'augmenter la vitesse d'oxydation (Johannes et Majcherczyk, 2000a ; Burton, 2003). Le médiateur joue le rôle de transporteur d'électrons entre le substrat et l'enzyme (figure 40). L'efficacité d'un tel système dépend du potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme, de la stabilité du radical formé et de la réactivité de ce dernier (Johannes et Majcherczyk, 2000b). L'efficacité des médiateurs augmente lorsqu'ils sont substitués par des groupements électrodonneurs (Xu *et al.*, 2001).

De nombreux médiateurs sont actuellement recherchés parmi lesquels, on peut citer :

- des médiateurs synthétiques (figure 41, Riva, 2006). Le plus connu des médiateurs d'oxydation utilisé est l'ABTS (acide 2,2'-Azino-Bis (3-éthylbenz-Thiazoline-6-Sulfonique) ;
- des médiateurs dérivés de la lignine (Acétosyringone ; syringaldéhyde ; 2,6-diméthylphénol ; 2,4,6-triméthoxyphénol ; éthyle vanilline ; acétovanillone ; vanilline ; alcool vanillique ; méthyl vanillate ; *p*-coumaric acid) (Camarero *et al.*, 2005) ;
- des médiateurs synthétiques dérivés de la phényl-méthyl-pyrazolones, de l'acide benzoïque et de la N-hydroxynaphthalimide (Shumakovich *et al.*, 2006) ;
- des composés N-hydroxy dérivés de l'acétanilidine et de l'hydroxybenzotriazole (HBT) (Xu *et al.*, 2001).

## **2.6.7 Influence des paramètres physico-chimiques**

### **2.6.7.1 pH optimum**

Les laccases ont un pH optimum se situant entre 3 et 7 (tableau 8), elles sont inactives à pH = 2. Robles *et al.* (2000) ont testé les laccases induites par 9 souches distinctes de *Chalara paradoxa* et ont trouvé 2 pH optima différents selon le type de substrat utilisé.

### **2.6.7.2 Température**

L'origine de l'enzyme est un élément déterminant dans sa thermosensibilité.



La laccase de *Trametes versicolor* est thermostable (température optimale entre 50 et 60 °C, Lacki et Duvnjak, 1996 ; Robert, 2001). La laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* l'est également, un traitement à 60 °C pendant une heure ne modifie pas son activité (Schliephake *et al.*, 2000). En revanche, les températures optimales des laccases de *Chalara paradoxa* varient entre 10 et 37 °C (Robles *et al.*, 2000).

### 2.6.7.3 Inhibiteurs

Différents inhibiteurs existent qui peuvent agir sur l'enzyme, sur les substrats voire sur les produits d'oxydation, voire sur plusieurs réactants en même temps. Parmi ceux-ci :

- Les chélateurs de métaux (cyanure, diéthyl-dithiocarbamate, 2-mercaptobenzothiazole, azoture,  $\text{Hg}^{2+}$ , fluorure, EDTA (Zawitowski *et al.*, 1991 ; Xu, 1996) agissent au niveau des atomes de cuivre (élément essentiel de la catalyse, voir chapitre « mécanisme d'action des laccases »). Ainsi, les halogénures ont un pouvoir inhibiteur en formant un complexe avec le cuivre. Pour ces derniers, l'accessibilité au site actif est limité par l'encombrement stérique, et par conséquent, le pouvoir inhibiteur est d'autant plus fort que l'ion est petit ( $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ ). L'azoture est souvent cité comme un inhibiteur irréversible très efficace à 0,1 mM (Johannes et Majcherczyk, 2000a). Lacki et Duvnjak (1996) rapportent également un effet important du méthanol et du peroxyde d'hydrogène ;

- L'acide thioglycolique, les acides gras, l'hydroxyglycine, l'acide kojique et les détergents cationiques (ammoniums quaternaires) peuvent provoquer la perte des propriétés catalytiques (Gianfreda *et al.*, 1999) ;

- Les agents réducteurs (sulfites, acide ascorbique, thiols) régénèrent les quinones. L'effet inhibiteur disparaît lorsque la totalité du réducteur est consommé (Robert, 2001).

## 2.7 Applications technologiques des laccases

Leur abondance, leur diversité font que les laccases sont une source enzymatique importante et potentiellement intéressante. Par ailleurs, leur stabilité et leur réactivité, ajoutée



à la possibilité de les utiliser dans des conditions faciles à mettre en œuvre (pH, température) ont contribué à en faire des outils très étudiés dans des applications très diverses (Minussi *et al.*, 2002) aussi bien dans les domaines agroalimentaire et médical que dans le domaine de l'environnement (traitement des eaux usées notamment).

Ainsi, selon Madzak *et al.* (2005), les systèmes enzymatiques étudiés ont pu être améliorés par génie génétique (augmentation de l'efficacité, facilité de production), de même, l'utilisation de systèmes médiateurs, améliorant l'oxydabilité des composés, et récemment, leur utilisation en milieu non conventionnels ont contribué à favoriser l'emploi de ces enzymes. Des études toxicologiques ont montré que les laccases de *Myceliophthora thermophila* et *Polyporus pinsitus* pouvaient être utilisées sans crainte dans les domaines cosmétique et alimentaire (Brinch et Pedersen, 2002a ; Brinch et Pedersen, 2002b). L'intérêt technologique des laccases se situe dans leur capacité à engendrer des réactions de polymérisation, de dépolymérisation, éliminer l'O<sub>2</sub> contenu dans le milieu, modifier la couleur, former des produits réactifs capables de neutraliser des composés indésirables.

### 2.7.1 Valorisation des polysaccharides

Les réactions de polymérisation des polysaccharides (Ishii, 1997) catalysées par la laccase interviennent dans la mise au point d'agents de texture, notamment d'agents gélifiants :

- *gélification oxydative de pectines de betterave.*

Les pectines sont des polysaccharides composés de plusieurs résidus glucidiques (acide galacturonique, rhamnose, galactose, arabinose) estérifiés pour certains par des résidus d'acide férulique (Couteau et Mathaly, 1997). La gélification oxydative des pectines de betteraves est un moyen de modifier leurs propriétés fonctionnelles en vue de les valoriser (Micard et Thibault, 1999).

- *gélification oxydative des arabinoxylanes de blé*

La gélification oxydative des arabinoxylanes de blé a été étudiée par Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998a, 1998c, 1999b et 1999a, et Figueroa-Espinoza et Rouau, 1999 en raison notamment de sa capacité à modifier les propriétés rhéologiques de la pâte à pain. De même, Carvajal-Millan *et al.* (2005b) ont étudié l'impact de la gélification des pentosanes sur leur capacité à immobiliser les protéines.

- *synthèse de plastiques thermostables*



Kobayashia et Higashimurab (2003) décrivent la synthèse d'un plastique thermostable (poly phénylène éther) par polymérisation oxydative de 2,6-diméthoxyphénol.

## **2.7.2 Applications industrielles**

### **2.7.2.1 Traitement des eaux usées.**

Dans certaines industries (boissons, pétrolières, textile, pâte à papier), les effluents industriels contenant des composés toxiques (hydrocarbures aromatiques, phénols, chlorophénols, etc) peuvent être décontaminés par l'action des laccases selon deux mécanismes :

- *insolubilisation des composés par polymérisation* (Dec et Bollag, 1990). Les polymères insolubles sont ensuite éliminés par filtration ou sédimentation (Torres *et al.*, 2003) ;
- *dégradation des hydrocarbures polycycliques (PAH) difficilement oxydables* (Majcherczyk *et al.*, 1998).

### **2.7.2.2 Stabilisation des boissons.**

L'élimination sélective des dérivés phénoliques permet la stabilisation des boissons telles que la bière, le vin ou les jus de fruit (Minussi *et al.*, 2002). Dans le cas du vin, les laccases peuvent également modifier certaines caractéristiques organoleptiques désagréables comme l'astringence (Xu, 2005).

### **2.7.2.3 Industries textiles, des colorants, de la pâte à papier**

Dans ces industries, les procédés relatifs à la décoloration (dégradation de colorant, blanchiment) utilisent les laccases, principalement avec des systèmes médiateurs (Schliephake *et al.*, 2000 ; Baldrian, 2004 ; Knutson et Ragauskas, 2004 ; Camarero *et al.*, 2005 ; Sigoillot *et al.*, 2005 ; Zille *et al.*, 2005). Dans les industries du papier, les systèmes laccase/médiateur sont, de plus, utilisés pour dégrader la lignine lors de l'extraction de la pulpe évitant l'utilisation de produits chimiques chlorés par exemple (Srebotnik et Hammel, 2000).



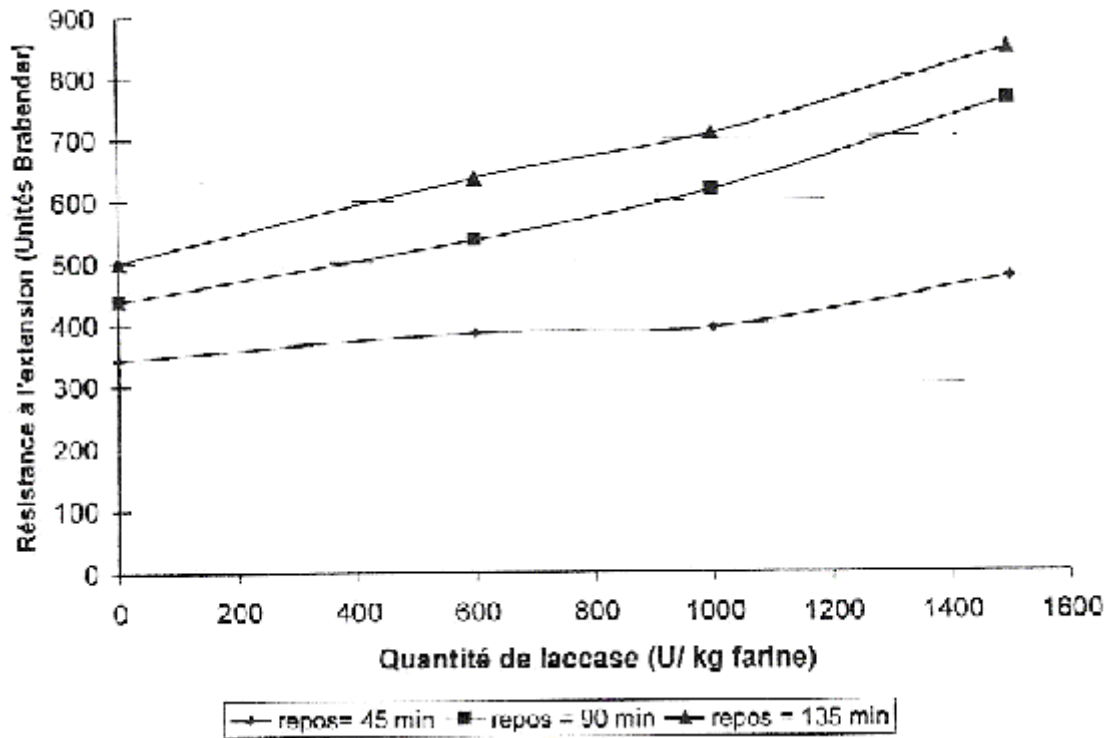


Figure 42. Evolution de la résistance à l'extension d'une pâte de farine selon la quantité de laccase ajoutée (d'après Si, 1994)

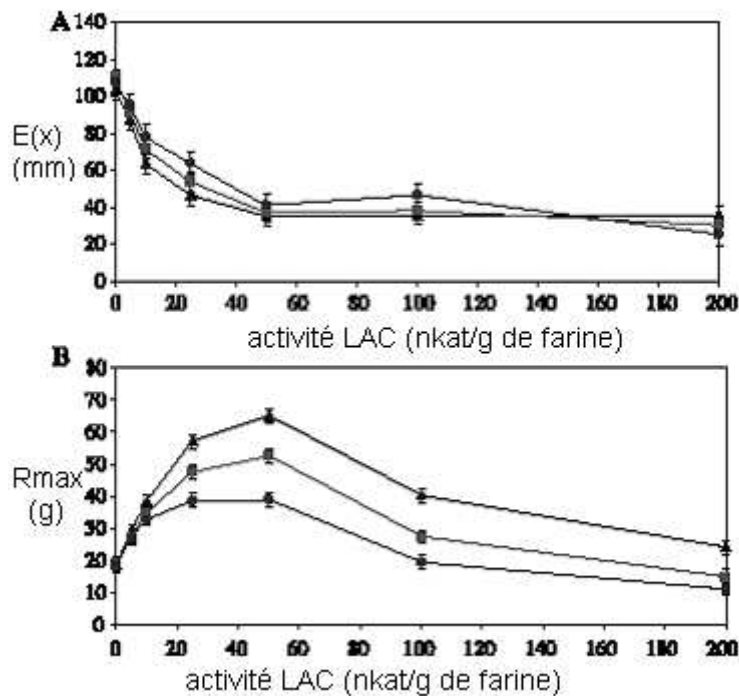


Figure 43. Effet de la dose (5 – 200 nkat.g<sup>-1</sup> ms) de laccase semi-purifiée de *Trametes hirsuta* sur la résistance à l'extension (Rmax, B) et l'extensibilité (E(x), A) de la pâte au maximum de résistance en fonction du temps de repos : (▲) 15 min, (■) 30 min, (●) 45 min. (Selinheimo *et al.*, 2006)

#### **2.7.2.4 Immobilisation des enzymes**

Asther *et al.* (2005) constatent qu'il est en général indispensable de fixer la laccase sur un support afin d'augmenter son action dans le traitement des eaux usées pour améliorer sa stabilité et permettre sa réutilisation. Dans d'autres domaines, de plus en plus d'applications font référence à l'immobilisation des enzymes. C'est le cas par exemple des cellules « biofuel » (Barriere *et al.*, 2006) développées dans le domaine biomédical. Dans le domaine de la lignification, Shleev *et al.* (2006) ont développé une électrode sur laquelle est immobilisée une laccase pour le suivi de la solubilisation des lignines.

### **2.7.3 Industries de panification : effet des laccases fongiques**

#### **2.7.3.1 Sur la qualité des pâtes**

Dès 1994, Si a montré que l'ajout de la laccase produite par *Rhizoctonia solani* avait un effet améliorant significatif sur la qualité boulangère de la farine puisqu'elle augmente la stabilité de la pâte et le volume du pain et diminue le caractère collant de la pâte. Des résultats similaires (augmentation du volume) ont été décrits par Arnaut *et al.* (2006) en utilisant une laccase recombinante exprimée chez *Aspergillus ficuum*.

L'effet de la laccase sur le caractère collant de la pâte est par ailleurs remis en cause. En effet, nous verrons dans la suite de l'étude qu'en présence d'un extrait brut de laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la pâte présente un fort collant, qui devient important si la dose ajoutée est importante.

L'augmentation de stabilité de la pâte lors de l'ajout de laccase produite par *Rhizoctonia solani* est contradictoire avec les observations de Labat *et al.* (2000a) qui décrivent plutôt une diminution de la tolérance au surpétrissage.

#### **2.7.3.2 Sur les propriétés rhéologiques**

L'addition d'une laccase produite par *Rhizoctonia solani* à la pâte permet d'augmenter la résistance à l'extension de la pâte (Si, 1994). Cet effet s'accroît avec la quantité de laccase ajoutée et avec la durée du repos de la pâte avant la mesure de son extensibilité (figure 42).

Récemment, Selinheimo *et al.* (2006) montrent que l'augmentation maximale de la résistance ( $R_{max}$ ) à l'extension déterminée par le test de Kieffer est obtenue pour une dose optimale de laccase semipurifiée de *Trametes hirsuta* de  $50 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$  (figure 43). A cette

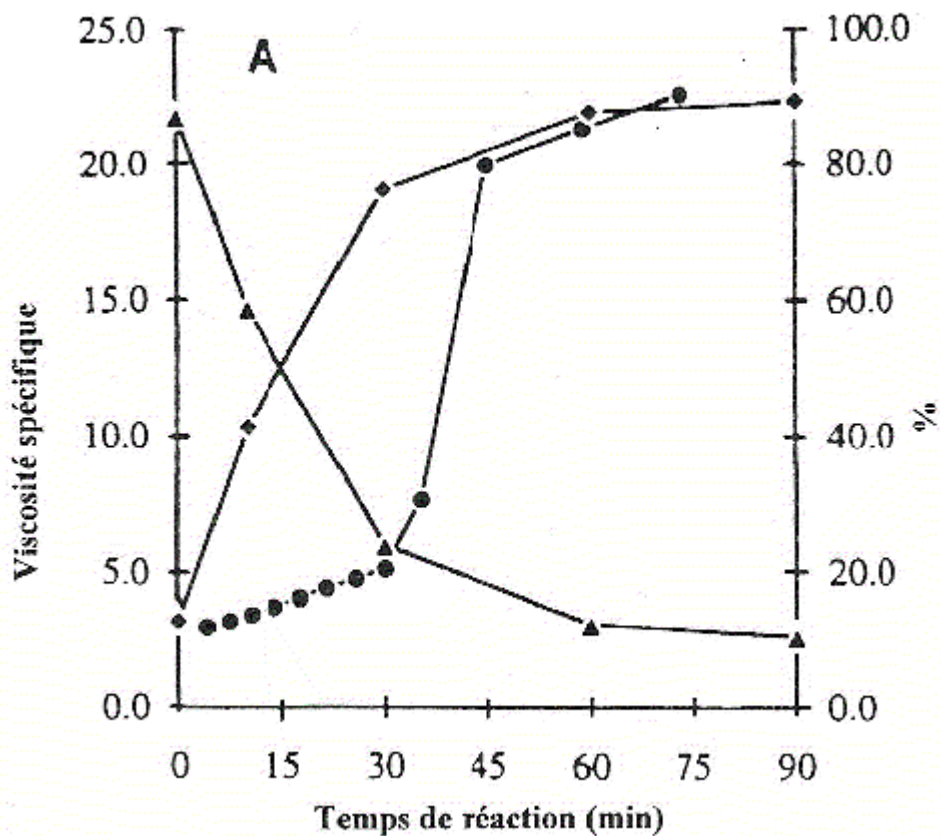


Figure 44. Effet de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* sur une solution d'arabinoxylanes (0,2 % w/v). (●) viscosité spécifique. (▲) teneur en acide férulique (% par rapport à la quantité initiale). (■) dimères d'acide férulique (% par rapport à la quantité initiale d'acide férulique. (Figueroa-Espinoza et Rouau., 1998)

dose, la diminution de l'extensibilité ( $E(x)$ ) au maximum de résistance est la plus importante. De plus, lorsque la pâte est laissée au repos, l'augmentation du  $R_{max}$  est moins prononcée si le temps de repos est plus long. Après la formation d'un réseau d'arabinoxylanes, l'activité oxydante se poursuivrait, entraînant une dépolymérisation de ce réseau, responsable de la perte des effets positifs observés sur les paramètres.

Par ailleurs, ces auteurs signalent que les effets observés sont moins importants en présence de xylanase ou sur des pâtes de gluten. L'ajout de laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (ou de peroxydase) lors du pétrissage d'une pâte reconstituée de gluten et de pentosanes solubles conduit à l'amélioration de la consistance de la pâte (Labat *et al.*, 2001).

Primo-Martin *et al.* (2003) ont observé seulement une diminution de l'extensibilité de la pâte additionnée de laccase commerciale au maximum de résistance (test de Kieffer), accentué en présence de pentosanase. Les mesures de résistance à l'extension sont réalisées sur des pâtes après 20 min de repos (Kieffer *et al.*, 1998). Outre ce temps de repos, l'activité enzymatique incorporée peut influencer l'amélioration ou non des paramètres. Ces résultats suggèrent que la laccase conserve ses propriétés oxydantes (peu de dénaturation de l'enzyme) après le pétrissage et devrait être inactivée pour conserver les effets bénéfiques observés. Caballero *et al.* (2007) confirment également que pour des temps de repos longs lors de la préparation des échantillons de pâte à analyser (supérieurs à 30 min), l'addition d'une laccase commerciale à la pâte n'améliore pas ses caractéristiques rhéologiques au contraire de la transglutaminase.

### **2.7.3.3 Sur les structures macromoléculaires**

#### **2.7.3.3.1 Gélification oxydative des arabinoxylanes**

Des solutions diluées de pentosanes peuvent gélifier (Neukom et Markwalder, 1978) après ajout d'agents oxydants (agents chimiques, système  $H_2O_2$  / peroxydase par exemple). Ce phénomène a aussi été constaté lors de l'ajout d'une laccase de *P. cinnabarinus* à une solution d'arabinoxylanes féruloylés hydrosolubles (0,2 % w/v). Lors de la gélification oxydative des arabinoxylanes, Figueroa-Espinoza *et al.* (1998b) observent une diminution de la teneur en AF estérifié et une augmentation proportionnelle de la quantité de déhydrodimères d'AF (figure 44) entraînant la réticulation des molécules de pentosanes (formation d'un gel après 30 min). Ceci se traduit par une augmentation de la viscosité de la solution d'AX et une diminution de l'extractibilité des arabinoxylanes.

## Travaux antérieurs

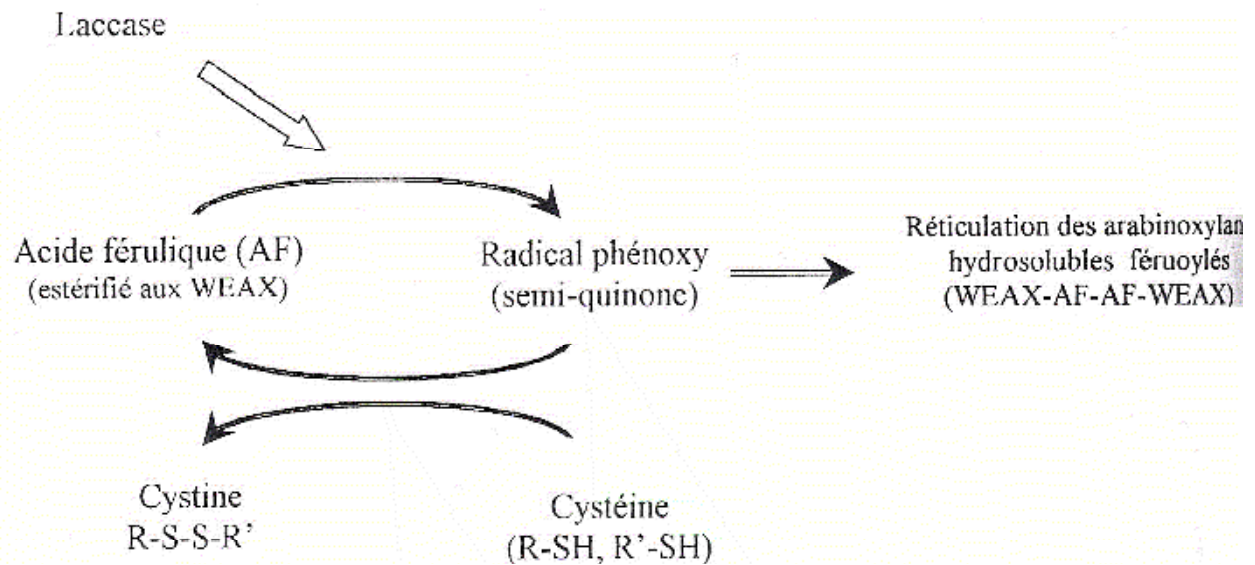


Figure 45. Hypothèse sur l'action des radicaux feruoyl générés lors de l'oxydation des arabinoxalnes par la laccase. WEAX : arabinoxalnes hydro-solubles (d'après Figueroa-espinosa *et al*, 1998)

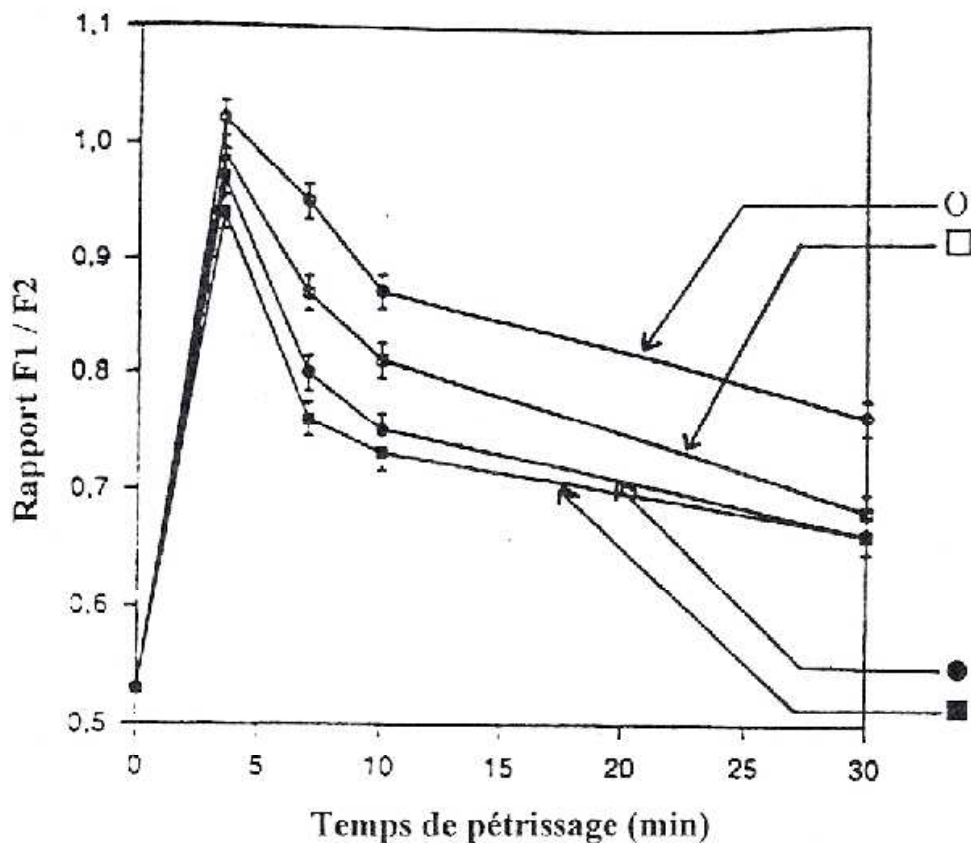


Figure 46. Modification de la répartition de la taille des polymères de protéines au cours du pétrissage, évaluée par le rapport des gluténines de haut poids moléculaire sur gluténines de faible poids moléculaires (F1/F2). (○) Témoin. (●) Acide férulique (AF). (□) laccase. (■) laccase + AF. (Labat, 2000)

Figueroa-Espinoza et Rouau (1998c) ont constaté que l'AF libre, le méthylfêrulate ou l'acide vanillique (contenant un noyau aromatique mais sans double liaison) retardent la gélification au contraire de l'acide fumarique (contenant une double liaison mais pas de noyau aromatique), ce qui suggère que le site d'initiation de la réticulation des AX est le noyau aromatique et non pas la chaîne propénoïque de l'AF.

Ce retard de la gélification a aussi été mis en évidence en présence de thiols (cystéine et glutathion réduit) alors que la tyrosine, la lysine et le glutathion oxydé n'ont pas d'effet (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998a). Le retard est proportionnel à la concentration en thiols. Par ailleurs, la cystéine n'est pas consommée en présence de laccase seule (ou d'AF libre seul) mais elle est oxydée en cystine si les 2 sont ajoutés ensemble (figure 45). Par conséquent, l'AF oxydé par la laccase en semi-quinone serait régénéré par une réaction d'oxydation couplée des thiols en ponts disulfures expliquant le retard de la gélification. Les thiols n'établissent pas de liaison avec les AF estérifiés des AX au cours de cette réaction et la laccase ne semble pas pouvoir créer de liaisons covalentes entre les protéines et arabinoxylanes puisqu'elle conduit à l'oxydation des groupes SH en ponts disulfures (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998). L'incapacité de cette laccase à former des complexes covalents entre AX et protéines a été confirmée par Labat *et al.* (2000).

### 2.7.3.3.2 Modifications des interactions pentosanes-protéines

Labat *et al.* (2000a) ont ajouté une préparation de laccase de *P.cinnabarinus* à une pâte de farine. Au cours du pétrissage, ils ont constaté une formation de la pâte plus rapide puis un affaiblissement de la pâte en présence de laccase (effets amplifiés par ajout d'AF libre) ainsi qu'un léger renforcement de la consistance maximale (figure 46). Ils ont aussi observé un changement dans la répartition de la taille des protéines, notamment du rapport des gluténines de haut poids moléculaires sur les gluténines de faibles poids moléculaires. L'ajout de laccase semble accroître la vitesse de dépolymérisation et l'effet est renforcé en présence d'AF).

Selon Labat *et al.* (2000a), cette dépolymérisation des gluténines est reliée à l'oxydation des groupes SH en suivant le mécanisme illustré dans la figure 47. Le cisaillement effectué par le pétrissage entraînerait la rupture des ponts disulfures (PSSP) formant des radicaux thiyls ( $PS^\bullet$ ). Ces radicaux seraient transférés sur un thiol plus petit (RSH) pour former une espèce labile  $RS^\bullet$ . Par ailleurs, l'AF est oxydé par la laccase en radicaux phénoxy ( $FA^\bullet$ ) très réactifs qui, par réaction couplée avec RSH, forment d'autres  $RS^\bullet$ . Dès lors, la plupart des RSH présents dans la farine seraient rapidement oxydés en  $RS^\bullet$  qui

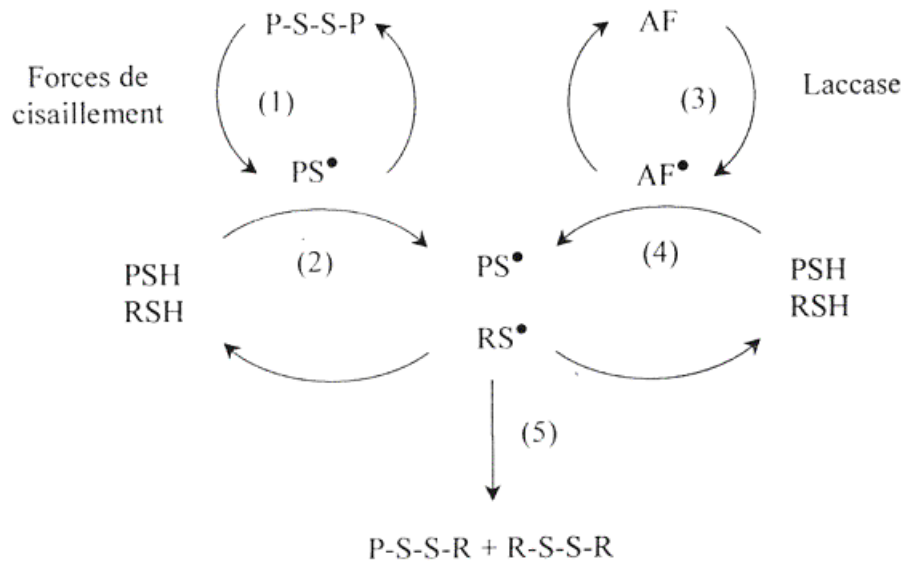


Figure 47. Réactions proposées pour expliquer l'action de l'AF en présence ou non de laccase pendant le pétrissage (Labat, 2000). PSSP : protéine oxydée ; PSH : protéine réduite ;  $PS^\bullet$  : radical thiyl protéique ; RSSR : peptide oxydé ; RSH : peptide réduit ;  $RS^\bullet$  : radical thiyl peptidique.

peuvent réagir immédiatement avec d'autres radicaux thiyls ( $RS^\bullet$  ou  $PS^\bullet$ ) pour donner PSSR et RSSR. Ces réactions de condensation, accélérées par la présence d'AF mèneraient à un blocage partiel des groupes SH du gluten qui ne seraient alors plus disponibles pour des réticulations protéines-protéines. Selon ces auteurs, l'effet des laccases est donc plutôt négatif puisqu'il conduit à une dépolymérisation des protéines et donc à un affaiblissement de la pâte et une moins bonne tolérance au surpétrissage.

Par ailleurs, Primo-Martin *et al.* (2003) ont étudié les effets obtenus par l'ajout de laccase sur le macropolymère gluténique (GMP). En présence de laccase, le gluten index augmente, le poids humide du GMP augmente mais, la quantité de protéine dosée et la densité diminue. De plus, la quantité de pentosanes totaux présents dans le GMP augmente significativement (près de 80 %) tandis que le rapport des pentosanes solubles sur pentosanes totaux diminuent fortement. Ces résultats soulignent que les modifications des interactions entre les pentosanes polymérisés au sein du GMP. La conséquence rhéologique est une diminution du module d'élasticité de la pâte ( $G'$ ). Ces auteurs signalent enfin des effets similaires obtenus en présence de pentosanase associée à la laccase, et différents en présence de glucose oxydase (augmentation du  $G'$  notamment). Par ailleurs, Primo-Martin *et al.* (2004) concluent leur étude sur le macropolymère gluténique (effet des laccases notamment sur des GMP de provenance différente) sur un effet direct plutôt mineur de celles-ci, soulignant en revanche, que l'association des sous unités gluténiques avec les arabinoxylanes pouvaient engendrer des modifications sur les propriétés du GMP.

En conclusion, l'ajout de laccase dans une pâte permet la gélification oxydative des arabinoxylanes, conduisant dans un premier temps à leur polymérisation. Les interactions de ce réseau formé avec les gluténines (macropolymère) sont modifiées, entraînant des modifications des propriétés rhéologiques. Les interactions entre les réseaux de gluten et d'arabinoxylane sont de nature non covalente. En revanche, il semble que des échanges de radicaux libres modifient directement les échanges thiols/disulfures au sein du gluten (rôle médiateur de l'AF). Lorsque l'action de l'enzyme se prolonge, celle-ci semble pouvoir dépolymériser le réseau de pentosanes. De même, il est possible d'envisager un effet néfaste des radicaux générés continuellement par la laccase sur les échanges thiols/disulfures. Ainsi, les résultats observés sont contradictoires et à l'heure actuelle, il apparaît difficile de proposer une explication unique sur le mode d'action des laccases en panification.





## 3 MATERIELS ET METHODES

**Tableau 9. Caractéristiques biochimiques des farines (% mh : en pourcentage de la matière humide ; % ms : en pourcentage de la matière sèche)**

| variétés | Protéines<br>(% mh) | Teneur en eau<br>(% mh) | Hagberg<br>(s) | taux de cendres<br>(% ms) |
|----------|---------------------|-------------------------|----------------|---------------------------|
| CN04     | 10,8                | 14,4                    | 283            | 0,57                      |
| CNS      | 11,8                | 14,8                    | 301            | 0,59                      |
| BPMF     | 11,4                | 14,9                    | 301            | 0,59                      |
| AP       | nd                  | nd                      | nd             | nd                        |
| AU       | 10,5                | 13,5                    | 363            | 0,65                      |
| CA       | nd                  | nd                      | nd             | nd                        |
| ME       | 10,9                | 15,4                    | 327            | 0,58                      |
| NI       | 11,7                | 14,9                    | 328            | 0,59                      |
| OR       | nd                  | nd                      | nd             | nd                        |
| QB       | 12,74               | 15,4                    | 312            | 0,65                      |
| S1       | 11,42               | 15,8                    | 317            | 0,56                      |
| S2       | 12,05               | 15,3                    | 342            | 0,54                      |

**Tableau 10. Caractéristiques alvéographiques et farinographiques des farines étudiées**

| Variétés | Données issues de l'alvéographe      |      |    |      |      | Données issues du  |                    |                                  |
|----------|--------------------------------------|------|----|------|------|--------------------|--------------------|----------------------------------|
|          | W<br>( $10^{-4}$ J.g <sup>-1</sup> ) | G    | P  | P/L  | le   | hydratation<br>(%) | stabilité<br>(min) | Affaiblissement<br>à 12 min (UB) |
| CN04     | 214                                  | 25,1 | 63 | 0,5  | 48,4 | 57                 | 6,25               | 100                              |
| CNS      | 198                                  | 27,1 | 54 | 0,36 | 47,8 | 53,9               | 7                  | 80                               |
| BPMF     | 232                                  | 23,2 | 72 | 0,66 | 50,9 | 56,9               | 3,5                | 100                              |
| AP       | 197                                  | 24,8 | 59 | 0,48 | 48,1 | 56,1               | 6                  | 90                               |
| AU       | 147                                  | 25,7 | 50 | 0,38 | 40   | 55,12              | 4,4                | 110                              |
| CA       | 272                                  | 20,4 | 90 | 1,06 | 58,2 | 58,7               | 2,5                | 110                              |
| ME       | 176                                  | 20,9 | 70 | 0,8  | 43,9 | 57,42              | 4,3                | 110                              |
| NI       | 244                                  | 22,9 | 80 | 0,76 | 49,4 | 59,9               | 41                 | 120                              |
| OR       | 202                                  | 24,6 | 63 | 0,52 | 46,2 | 56,1               | 5                  | 90                               |
| QB       | 269                                  | 21,9 | 89 | 0,93 | 52   | 59,4               | 4,3                | 100                              |
| S1       | 287                                  | 21,7 | 92 | 0,97 | 55,3 | 57,8               | 2,3                | 110                              |
| S2       | 228                                  | 25,6 | 65 | 0,5  | 49,2 | 58                 | 4,75               | 100                              |

**Tableau 11. Résultats obtenus pour les farines étudiées lors du test de panification normalisé BIPEA. (nd : non déterminé)**

| variétés | hydratation<br>(%) | note de<br>pâte | note de<br>pain | note de<br>mie | Vol <sub>2h</sub><br>(cm <sup>3</sup> ) | Vol <sub>2h30</sub><br>(cm <sup>3</sup> ) | note<br>totale |
|----------|--------------------|-----------------|-----------------|----------------|---|---|----------------|
| CN04     | 61                 | 86              | 78              | 100            | nd                                      | nd  | 264            |
| CNS      | 60                 | 92              | 72              | 100            | nd                                      | nd  | 263            |
| BPMF     | 59                 | 83              | 73              | 100            | nd                                      | nd  | 256            |
| AP       | 59                 | 100             | 78              | 100            | 1556                                    | 1792                                      | 278            |
| AU       | 59                 | 90              | 58              | 100            | 1544                                    | 1600                                      | 248            |
| CA       | 59                 | 76              | 83              | 94             | 1737                                    | 2045                                      | 253            |
| ME       | 59                 | 89              | 40              | 100            | 1444                                    | 1368                                      | 229            |
| NI       | 62                 | 93              | 84              | 100            | 1781                                    | 1851                                      | 277            |
| OR       | 58                 | 100             | 75              | 100            | 1468                                    | 1472                                      | 275            |
| QB       | 61                 | 92              | 80              | 97             | 1642                                    | 1878                                      | 269            |
| S1       | nd                 | nd              | nd              | nd             | nd                                      | nd  | nd             |
| S2       | 58,5               | 100             | 27              | 97             | 1501                                    | 1470                                      | 224            |

## **3.1 Matériel**

### **3.1.1 Farines**

En raison de limitation des volumes de stockage, quatre farines commerciales ont servi de farine témoin pour la mesure des différents effets (conditions de pétrissage, formulation, étude spécifique sur les laccases).

La farine BF14 est une base farine dont la teneur en eau est de 14 %. Cette farine a été utilisée lors des essais préliminaires de pétrissage avec le bioréacteur, notamment lors des premiers ajouts de laccase dans la pâte.

Les farines *corde noire* (CN04) et *corde noire spéciale* (CNS) sont des mélanges de différentes variétés de blé cultivées en France, dépourvues d'additif ou d'auxiliaire technologique. La *corde noire* est un mélange des récoltes de l'année 2004 et la corde noire spéciale de 2005. La farine BPMF est un mélange de blés panifiables pour la meunerie française (récolte de l'année 2005).

Dans le cadre de l'étude variétale 2005, les farines étudiées proviennent de moutures industrielles de 10 variétés pures de blé tendre de l'année 2005 fournies par les Moulins Soufflet (Corbeil-Essonnes 91). Ces farines ont été testées et caractérisées au moulin, dans le laboratoire d'analyse et de contrôle qualité, ainsi que par des tests de panification réalisés au sein du fournil du groupe Soufflet. Les 10 farines sont : Apache (AP), Aubusson (AU), Cap Horn (CA), Charger (CH), Mendel (ME), Nirvana (NI), Orvantis (OR), Quebon (QB) ainsi que deux variétés Sankara (S1 & S2). Les caractéristiques des farines utilisées sont regroupées dans le tableau 9 (taux de protéines, déterminé par mesure spectrophotométrique infra-rouge, la teneur en eau (AFNOR, 2002), la teneur en cendres (AFNOR, 1981), l'indice de chute d'Hagberg (AFNOR, 2004), dans le tableau 10 pour les résultats obtenus à l'alvéographe<sup>®</sup> (AFNOR, 2003) et au farinographe<sup>®</sup> (AFNOR, 1998) et dans le tableau 11 pour le test de panification BIPEA, AFNOR, 2002.

Dès leur arrivée, les farines sont conservées à -20 °C, dans des sacs en plastique étanches, afin de limiter toutes variations biochimiques dues au stockage.

**Tableau 12. Substrats redox utilisés**

| REACTIFS  | FORMULE  | PURETE   | FOURNISSEUR       |
|---|--|----------|-------------------|
| <i>Sucre</i>  |  |          |                   |
| $\beta$ -D-Glucose  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                                |          | VWR International |
| <i>Additifs ajoutés au pétrissage</i>   |  |          |                   |
| L-Cystéine, chlorhydrate  | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ,<br>HCl, H <sub>2</sub> O     | ≥ 99 %   | Sigma-Aldrich     |
| Acide L-ascorbique  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>                                 | ≥ 99 %   |                   |
| Bromate de potassium  | KBrO <sub>3</sub>  | ≥ 99,8 % |                   |
| Azodicarbonamide  | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N <sub>4</sub>                  |          |                   |
| <i>Acide gras</i>   |  |          |                   |
| Acide linoléique (C <sub>18:2</sub> ),<br>acide cis-9, cis-12-octadécadiénoïque | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>                               | ≥ 99 %   | Sigma-Aldrich     |
| <i>Composés phénoliques</i>   |  |          |                   |
| Acide férulique   | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                               | ≥ 98 %   | Sigma-Aldrich     |
| Acide sinapique   | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>                               | ≥ 97 %   |                   |
| Acide vanillique  | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                                 | ≥ 98 %   |                   |
| Acide syringique  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                                | ≥ 98 %   |                   |
| Acide <i>para</i> -coumarique   | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                                 | ≥ 99 %   |                   |
| Acide <i>trans</i> -cinnamique  | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                                 | ≥ 98 %   |                   |
| Acide <i>ortho</i> -coumarique  | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                                 | ≥ 98 %   |                   |
| Acide benzoïque   | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                                 | ≥ 99,5 % |                   |
| L-Tyrosine  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                               | ≥ 98 %   |                   |
| L-DOPA  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>                               |          |                   |
| ABTS : acide 2-2' – azino-bis<br>(3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)          | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> | ≥ 99 %   |                   |

Tableau 13. Réactifs et produits utilisés

| REACTIF   | FORMULE  | PURETE                       | FOURNISSEUR          |
|---|--|------------------------------|----------------------|
| <b>Sels</b>   |  |                              |                      |
| Chlorure de sodium  | NaCl   | Rectapur                     | VWR International    |
| Chlorure de calcium                                       | CaCl <sub>2</sub>  |                              |                      |
| Sulfate d'ammonium  | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | ≥ 99,5 %                     | Merck                |
| <b>Réactifs utilisés pour l'analyse des lipides</b>       |  |                              |                      |
| <i>Mélange équimassique d'esters méthyliques (étalon)</i> |  |                              |                      |
| Acide palmitique (C <sub>16</sub> )                       | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>                               | 99 %                         | Sigma-Aldrich        |
| Acide stéarique (C <sub>18</sub> )                        | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>                               | 99 %                         |                      |
| Acide oléique (C <sub>18:1</sub> )                        | C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>                               | 99 %                         |                      |
| Acide linoléique (C <sub>18:2</sub> )                     | C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>                               | 99 %                         |                      |
| Acide linoléique (C <sub>18:3</sub> )                     | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>                               | 99 %                         |                      |
| <b>Etalons internes</b>                                   |  |                              |                      |
| Acide margarique (C <sub>17</sub> )                       | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>                               | ≥ 98 %                       | Sigma-Aldrich        |
| Trimargarine (tri C <sub>17</sub> )                       | C <sub>54</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>                              | ≥ 99 %                       |                      |
| <b>Solvants – acides – antioxydants</b>                   |  |                              |                      |
| Acétone   | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O  | ≥ 99,8 %                     | Sigma-Aldrich        |
| Acide acétique  | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                                 | Normapur                     |                      |
| Acide formique  | CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | Normapur                     |                      |
| Butyl hydroxytoluène (BHT)                                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O  |                              | VWR International    |
| Chloroforme   | CHCl <sub>3</sub>  | Normapur                     |                      |
| Cyclohexane   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>   | Normapur                     |                      |
| Ether de pétrole (40-60 °C)                               |  | Normapur                     |                      |
| Ether diéthylique   | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O   | Normapur                     |                      |
| Heptane   | C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>   | Normapur                     |                      |
| Méthanol  | CH <sub>3</sub> OH   | Normapur                     |                      |
| Pentane   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>   | Normapur                     |                      |
| Primuline   | C <sub>21</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N <sub>9</sub> S <sub>3</sub> |                              | Sigma-Aldrich        |
| Trifluorure de Bore                                       | BF <sub>3</sub>  | 14 % dans CH <sub>3</sub> OH |                      |
| <b>Produits pour la chromatographie et électrophorèse</b> |  |                              |                      |
| <i>Chromatographie</i>                                    |  |                              |                      |
| Diéthylaminoéthyl-Sepharose CL6B                          |  |                              | Amersham Biosciences |
| Carboxyméthyl-trisacryl CMT                               |  |                              | Merck                |
| <i>Electrophorèse</i>                                     |  |                              |                      |
| Gels de polyacrylamide 10-15 %                            |  |                              | Amersham Biosciences |
| Gels de polyacrylamide IEF pI 3-9                         |  |                              |                      |
| Solutions d'ampholytes pI 3-9                             |  |                              | Bio Rad              |
| Bleu de Bromophénol                                       |  |                              | Bio Rad              |
| <b>Solvants, acides et bases</b>                          |  |                              |                      |
| Acétonitrile  | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N  | for HPLC                     | VWR International    |
| Acide acétique  | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                                 | for HPLC                     | Acros Organics       |
| Acide Chlorhydrique                                       | HCl  | Normapur                     | VWR International    |
| Ethanol   | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O  | 95 %                         |                      |
| Soude   | NaOH   | Normapur                     |                      |
| <b>Tensio-actif - détergent</b>                           |  |                              |                      |
| Tween 20 (Polyoxyéthylène-monolaurate de sorbitane)       |  | -                            | Sigma-Aldrich        |
| Sodium dodécyl-sulfate (SDS)                              |  | -                            |                      |

**Tableau 14. Caractéristiques des laccase étudiées fournies par la société Puratos<sup>®</sup>, *nc* : non connu.**

|                         | <b>AT</b> | <b>K1</b>   | <b>PC</b> | <b>TB</b> | <b>TSN</b> |
|-------------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|------------|
| Masse moléculaire (kDa) | 65        | 70          | 70        | 62        | 63         |
| pH optimum              | 3,5-4,5   | 5,5         | 4         | 4,5-5,5   | 5          |
| pI                      | 2,6       | <i>nc</i> * | 3,7       | 3,5       | 3          |

### **3.1.2 Produits et réactifs utilisés**

L'ensemble des produits et réactifs utilisés lors des différentes expériences sont regroupés dans les tableaux 12 (substrats redox) et 13 (autres produits). Les substrats redox, lorsqu'ils sont ajoutés dans la pâte sont :

- dissous dans l'eau distillée (cystéine, acide ascorbique, bromate) ;
- préparés en solution concentrée (10 mM) dans du tampon acétate 0,1 M à pH = 5,6. Le volume désiré est ensuite ajouté dans l'eau distillée (acide férulique, ABTS) ;
- directement ajoutés dans la farine (homogénéisés manuellement) (cas de l'ADA et du glucose).

Les sels de pureté analytique utilisés pour la préparation des solutions tampons ont été fournis par la société VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

Les gaz utilisés, azote (U) pour l'étalonnage de l'analyseur de gaz COSMA et pour la cartographie des lipides, ainsi que l'hydrogène (U), l'hélium (U) et l'air (azote-oxygène, 80/20) sont fournis par la société Air liquide. Il en est de même pour l'azote liquide utilisé pour la congélation des pâtes.

### **3.1.3 Enzymes et additifs de panification**

Lorsqu'une enzyme est ajoutée dans la pâte en présence de son substrat, la mise en contact est retardé le plus possible pour pouvoir mesurer les effets de la réaction, c'est-à-dire que les deux protagonistes des réactions redox mises en jeu sont mis en présence juste avant la fermeture de la cuve du pétrin et la mise en route du pétrissage.

#### **3.1.3.1 *Laccases fongiques***

Les échantillons de laccase sont fournis pas la société PURATOS sous forme de milieu de culture liquide issu du surnageant de fermentation filtré ou sous forme d'extrait purifié. 5 lots d'enzymes ont été testés : K1, TSN, AT, PC et TB. Certaines caractéristiques sont présentées dans le tableau 14.

Parmi les enzymes étudiées, la laccase issue du champignon de pourriture blanche *Pycnoporus cinnabarinus* (PC) a fait l'objet d'investigations plus poussées. L'extrait enzymatique est un extrait brut de couleur jaune-brun. De même l'enzyme recombinante K1



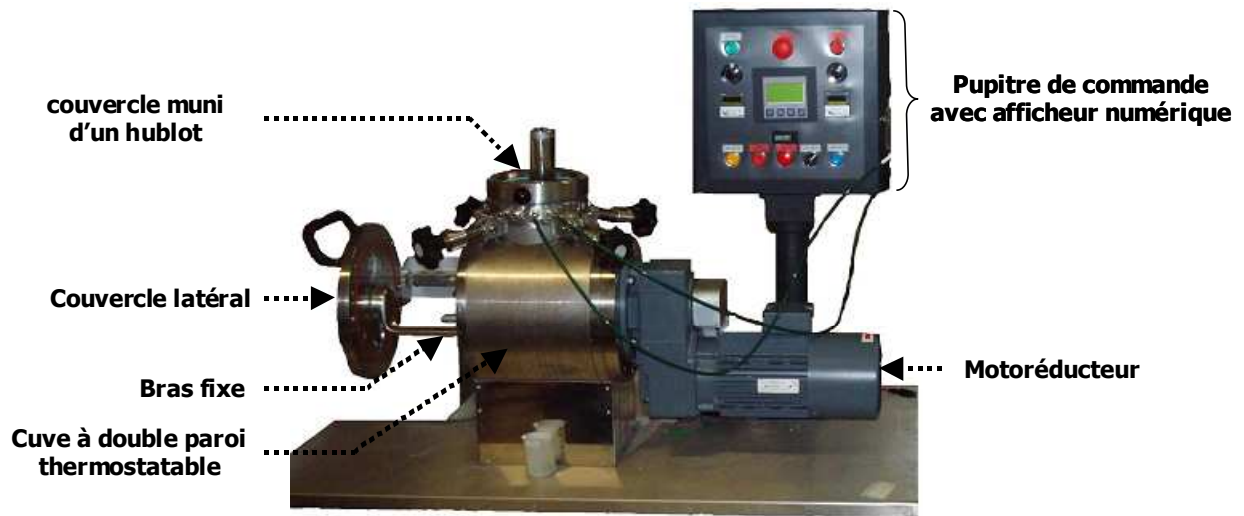


Figure 48. Photographie (vue de face) du sitoxygraphe instrumenté

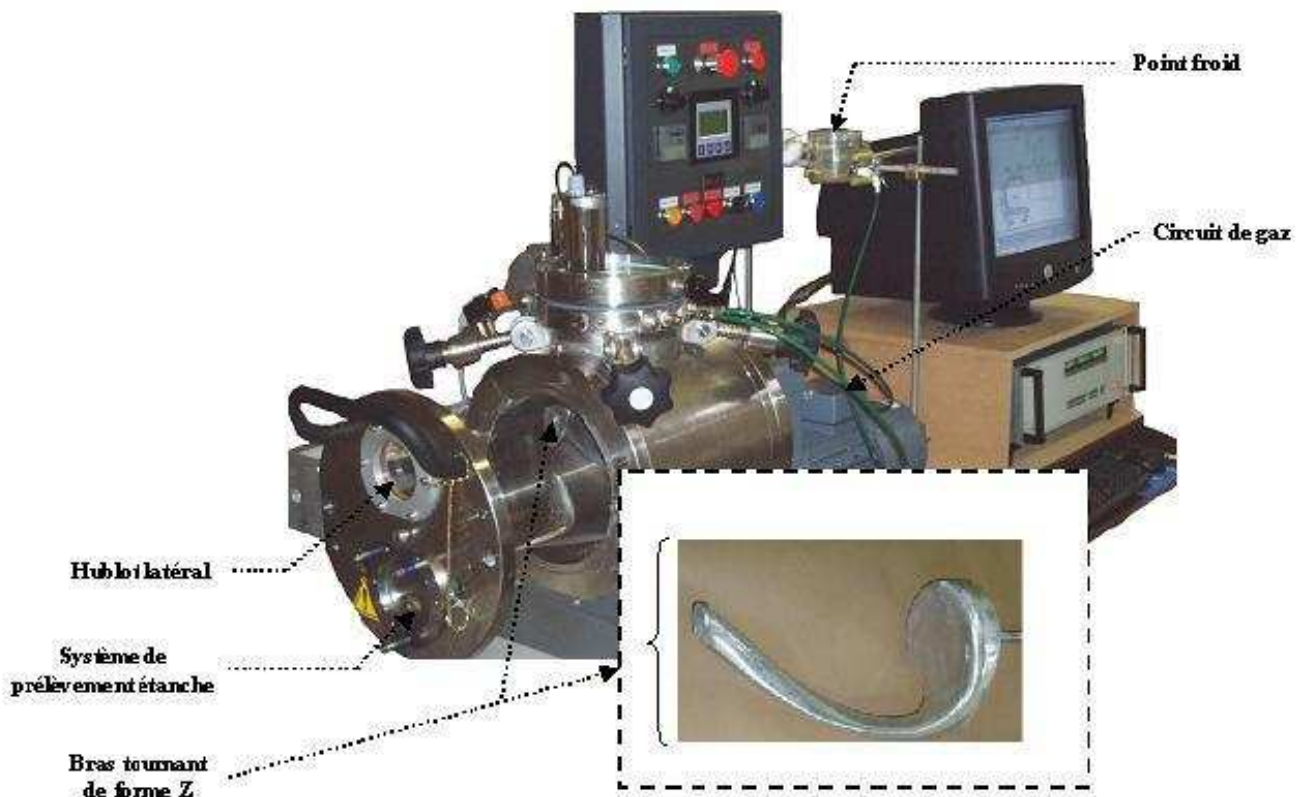


Figure 49. Photographie (vue de diagonale) du sitoxygraphe instrumenté

fournie sous forme purifiée a fait l'objet d'une attention plus spécifique dans le cadre d'application potentielle dans le domaine de la panification.

### **3.1.3.2 Glucose oxydase**

Le lot de glucose oxydase utilisé se présente sous forme de poudre fournie par la société Lyven. L'activité GOX déterminée en routine est obtenue par polarographie. Le dosage est réalisé à 30 °C dans un milieu réactionnel (Volume = 1,5 mL), constitué de tampon acétate 0,1 M à pH = 5,6 contenant du glucose 220 mM. L'activité du lot utilisé est 933  $\mu\text{kat.g}^{-1}$  (Garcia, 2000). Une solution concentrée (690  $\mu\text{kat.L}^{-1}$ ) de GOX est préparée dans de l'eau distillée. Dans le cas des pâtes hydratées à 55 %, 16 mL de cette solution sont ajoutés dans l'eau distillée pour 2,584 kg de farine humide pour obtenir une activité théorique dans la pâte de 6  $\text{nkat.g}^{-1}$  ms (dose optimale déterminée par Garcia, 2000).

### **3.1.4 Description du sitoxygraphe**

Fabriqué par la société LAMBERT, le sitoxygraphe (figure 48) est un pétrin horizontal d'une capacité de 8 L, permettant de pétrir des quantités de pâte compris entre 1,5 et 5 kg. La caractéristique principale de ce pétrin tient au fait que l'ensemble de la masse de pâte est pétrie à chaque tour de bras lui conférant une grande efficacité. A titre de comparaison, une vitesse de rotation de 52 rpm du bras mobile au sitoxygraphe équivaut à une vitesse de 200 rpm sur un pétrin spirale et 80 rpm sur un pétrin à axe oblique. D'après le constructeur, un pétrissage d'une dizaine de min à 52 rpm provoque une augmentation de température de pâte de + 6 °C.

#### La cuve

La cuve est composée d'un cylindre ( $\Phi_{\text{intérieur}} = 210$  mm,  $L_{\text{intérieure}} = 210$  mm) fermé par une porte latérale coulissant sur un rail de guidage et surmonté d'une cheminée fermée par un hublot articulé (figure 49). La paroi de la partie circulaire du cylindre est équipée d'un échangeur thermique étanche (usiné dans la masse) dans lequel circule de l'eau reliée à un cryostat (JULABO modèle F26), à un débit de 500  $\text{mL.min}^{-1}$ .

La porte latérale est utilisée pour la sortie de pâte et l'entretien du pétrin. Le couvercle supérieur sert à introduire les ingrédients. Au niveau de ces ouvertures, l'étanchéité est réalisée par des joints toriques. Les deux portes sont également munies de hublots pour

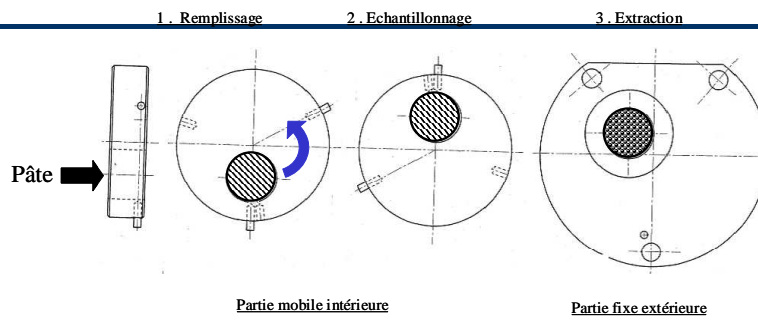


Figure 50. Principe de l'échantillonnage de pâte pendant le pétrissage.

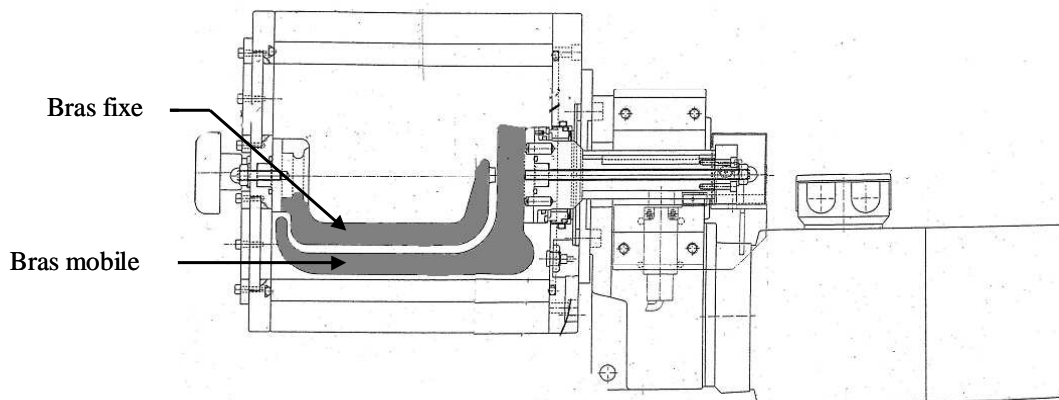


Figure 51. Position relative des bras dans la cuve du sitoxygraphe (vue de face).

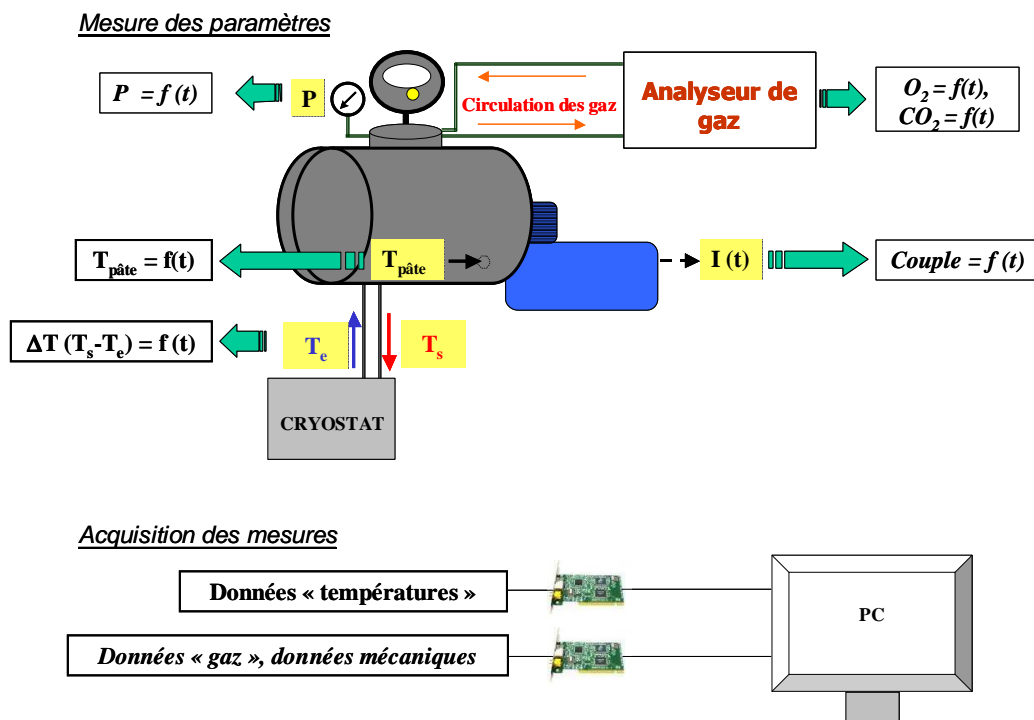


Figure 52. Positionnement des capteurs et acquisition des données mesurées sur le logiciel Labview®.

observer visuellement le pétrissage. La cheminée supportant le couvercle supérieur et la porte latérale sont également munies de perçages (étanches) pour la mise en place de capteurs.

Sur le couvercle latéral se trouve un système de prélèvement de 20 mL qui permet l'échantillonnage de pâte pendant le pétrissage sans rompre l'atmosphère confinée du pétrin. Pour prélever un échantillon de pâte, la cavité est amenée au contact de la cuve du pétrin. Le mouvement du bras tournant pousse l'échantillon de pâte dans la cavité du système de prélèvement. Une fois remplie, la cavité est déplacée, par un mouvement de rotation de la partie mobile du système (figure 50) et l'échantillon est amené vers l'orifice de sortie situé sur la partie extérieure fixe du système. Toutes les pièces du système de prélèvement sont polies et maintenues en pression par des vis de serrage munies de ressort. L'étanchéité est aussi réalisée par l'ajout de graisse de silicone entre les différentes pièces du système, facilitant le mouvement de rotation.

### Les bras

Inspiré de gestes ancestraux, le pétrissage tente de reproduire les mouvements de bras des boulangers pétrissant la pâte manuellement. Les deux bras du sitoxygraphe sont en fonderie inox (aluminium F76) et amovibles. Le bras tournant poli (en forme de Z) étire et comprime la pâte contre le bras fixe téflonné (en forme de U). La position relative de chacun des bras est présentée dans la figure 51.

Des essais préliminaires réalisés en présence d'un traceur coloré (café moulu) ont été réalisés pour étudier le mélange et la capacité d'homogénéisation du sitoxygraphe. Ajoutés en différents endroits (bout, base et milieu du bras tournant) et à différents instants ( $t = 0$  quand la pâte n'est pas formée ou pendant le pétrissage), nous avons pu constater que le sitoxygraphe homogénéise la pâte de façon très rapide, puisque entre 30 s et 1 min suffisent pour que les petits grains de café soient uniformément répartis dans la pâte (l'homogénéisation dans un pétrin oblique dure 2 min).

L'entraînement du bras est réalisé par un motoréducteur (KEB) d'une puissance de 1,5 kW piloté par un variateur de vitesse permettant une utilisation entre 15 et 30 rpm en petite vitesse et entre 30 et 75 rpm en grande vitesse.

### L'instrumentation

Les différents capteurs sont positionnés comme décrits sur le schéma de la figure 52 :

- un capteur de pression (ORPHY – GTS, MECACEL Electronique, France) fonctionnant dans une gamme de pression allant de 0 à 1,5 bar (pression relative) ;



- un analyseur de gaz CRISTAL 300 (COSMA, France) pour la mesure électrochimique de la teneur en O<sub>2</sub> (0-22 %), la mesure par infra rouge de la teneur en CO<sub>2</sub> (0-1 % et 0-50 %) permettant les mesures pour des conditions expérimentales avec et sans levure pendant le pétrissage et/ou la fermentation ;
- 1 sonde Pt100 (SIKA France) de type WI spé 1 (-15 à 100 °C) située sous la base du bras mobile (figure 52) pour la mesure de la température de pâte. Diamètre 15 mm, épaisseur 3 mm ;
- 2 sondes Pt 100 (SIKA France ) de type WS spé 1 (-15 à 100 °C ) placées au centre du liquide circulant dans les tuyaux du système de régulation respectivement en entrée et sortie de la cuve. Diamètre 3 mm, longueur 5 mm ;
- La mesure de couple est directement obtenue par un signal électrique provenant du variateur de vitesse pilotant le moteur. Ce signal (intensité électrique) est directement converti en couple à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie par le constructeur (KEB).

Transférées par des cartes d'acquisition séries (carte analogique numérique PCI NI 4351 et carte d'acquisition pour les températures NI PCI-6023 E, National Instrument) au système informatique, les données mesurées sont visualisées et enregistrées par un programme spécialement développé pour le sitoxygraphe par Alain Sommier (UMR GENIAL, Ensia, Massy) sous Labview<sup>®</sup>. L'acquisition est séquentielle et scindée en deux. Un ensemble de données (gaz, température, pression) constituent les données saisies en basse fréquence (intervalle d'acquisition de 1 à plusieurs dizaines de secondes), tandis qu'à intervalles de temps définis (de 1 à plusieurs centaines de secondes), il est possible d'acquérir les données en hautes fréquences (couple et vitesse) pendant un temps défini (limité par le nombre de données formant un fichier exploitable). La fréquence la plus forte est de 100 Hz. Nous avons couramment utilisé une fréquence de 50 Hz (soit une mesure toutes les 20 ms). Une acquisition se compose donc d'une alternance d'acquisitions basse fréquence et haute fréquence. Deux fichiers de données sont donc générées au format .txt.

### **3.1.5 Description du bioréacteur**

Le pétrin bioréacteur est un pétrin expérimental, étanche et thermorégulé instrumenté pour étudier la consommation d'oxygène et l'évolution de la consistance d'une pâte durant le pétrissage (Ameille, 1998). Il est composé d'une cuve en Pyrex d'environ 1,5 L munie d'une



Figure 53. Photographie de la cuve du pétrin bioréacteur instrumenté.

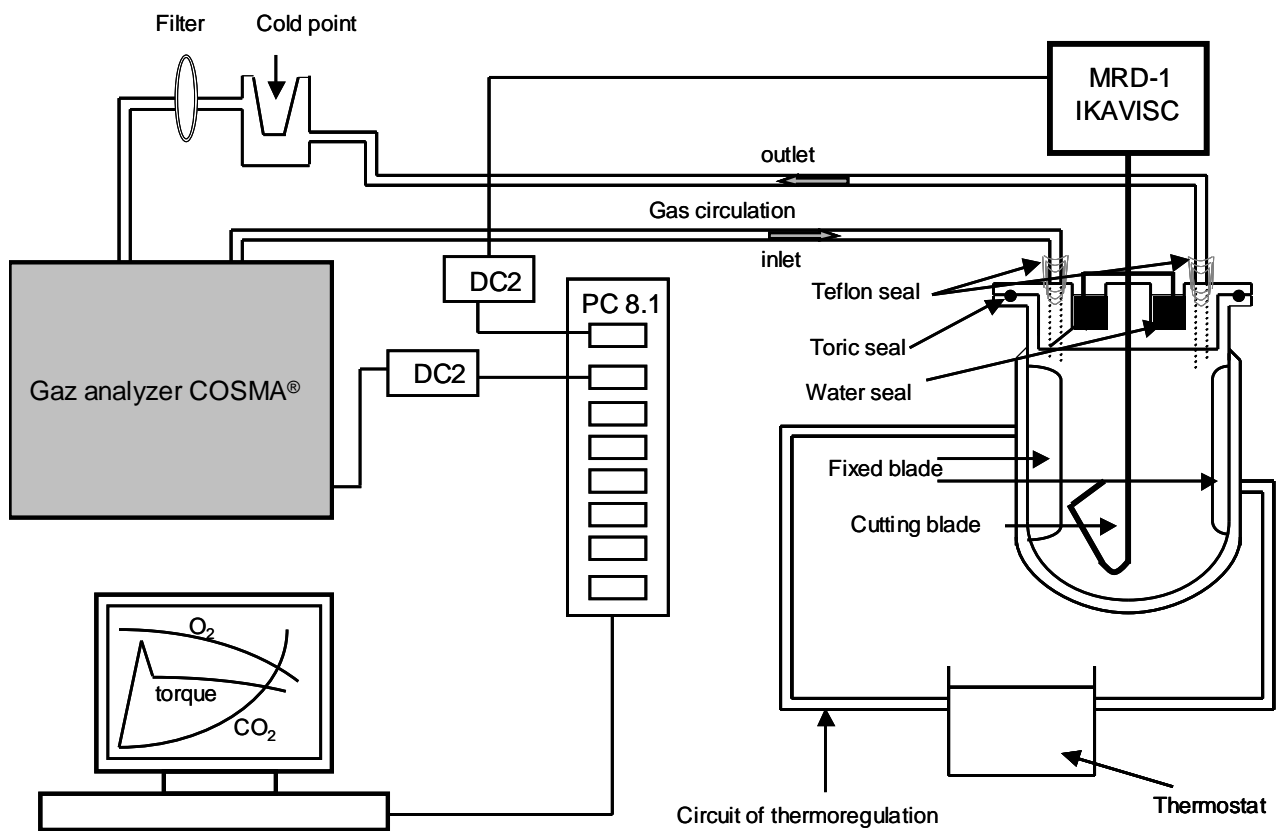


Figure 54. Schéma du pétrin bioréacteur instrumenté



double enveloppe dans laquelle circule de l'eau thermorégulée à 30 °C (figure 53).

L'étanchéité du bol est réalisée par un joint torique pressé par deux pinces de serrage au niveau du couvercle en plexiglas, par un joint liquide situé autour de l'axe du friseur et par deux joints en téflon situés à l'entrée et à la sortie du circuit gazeux (figure 54).

Le moteur d'agitation est un malaxeur-mesureur de couple (modèle MR-D1, IKAVISK, Allemagne). Le pétrissage des pâtes s'effectue par un friseur simple bras en acier inoxydable de type Z2CN18-10 en forme d'ancre marine (figure 53) de longueur 210 mm, de diamètre 10 mm et dont la base est située à 5 mm du fond du bol (Ameille, 1998). La cuve comporte par ailleurs, deux contre-pâles, l'une verticale et l'autre oblique pour favoriser l'homogénéisation de la pâte et éviter les phénomènes de cavitation lorsque la pâte s'enroule autour du bras. Le bloc moteur mesure en continu la vitesse du bras et l'évolution du couple assimilé à la consistance de la pâte.

Le bioréacteur permet de mesurer en continu le pourcentage d'oxygène et de CO<sub>2</sub> dans le bol du pétrin et, par la suite, de quantifier la consommation d'oxygène de la pâte à chaque instant du pétrissage. Pour cela, l'atmosphère gazeuse circule à un débit de 120 L.h<sup>-1</sup> à travers un analyseur de gaz de type Cristal 300 (Environnement SA<sup>®</sup>, France) relié à la cuve par des tuyaux en téflon comportant un capteur électrochimique pour la mesure du pourcentage d'O<sub>2</sub> et une cellule Infra-rouge pour la mesure du CO<sub>2</sub> (figure 54). En entrée du circuit, l'eau contenue dans l'air circulant est condensée au niveau du point froid à 0 °C et un filtre PTFE (maille de diamètre 0,2 µm) retient d'éventuelles particules solides. Le volume total du système cuve-analyseur de gaz est de 1,71 L (Manceau, *communication personnelle*). L'analyseur de gaz possède trois voies de mesure avec chacune une échelle propre :

- 0-22 % pour l'O<sub>2</sub> ;
- 0-1 % pour la voie CO<sub>2</sub> basse teneur, utilisée pour des pâtes ne comprenant pas de levure ;
- 0-100 % pour la voie CO<sub>2</sub> haute teneur (utilisée en présence de levure).

Tous les signaux analogiques mesurés (vitesse, couple, teneur en gaz) sont envoyées via une interface (DC2 control IKA) puis stockés dans un fichier .txt grâce au logiciel d'acquisition labworldsoft<sup>®</sup>. Le temps de scrutation pour chaque voie est de 100 ms, soit au mieux une donnée toutes les 500 ms pour chacun des 5 signaux analysés.

Le traitement des données est réalisé au moyen d'une macro développée sous Excel<sup>®</sup> (microsoft). Sur chaque paramètre mesuré, on réalise une moyenne glissante sur 10 valeurs. Le couple et la vitesse sont exprimés en N.cm et en rpm respectivement, les gaz sont mesurés en % et après transformation exprimés en µmol.g<sup>-1</sup> ms (Celhay, 2000).





## **3.2 Méthodes**

### **3.2.1 Préparation des pâtes**

Conservées à  $-20\text{ °C}$ , les farines sont lentement amenées à la température (24 h) avant d'être pétrées. Dans la plupart des essais, la pâte est constituée de farine, d'eau et de chlorure de sodium. Dans tous les cas, le NaCl est dissous dans l'eau distillée.

#### **3.2.1.1 Au sitoxygraphe**

La composition de base de la majorité des pâtes étudiées est farine – eau – chlorure de sodium. Dans le cas des pâtes témoin et des pâtes pétrées dans le cadre de l'étude variétale, la recette de pétrissage est la suivante :

- 2500 g de farine ;
- 1500 g d'eau distillée (60 %) ;
- 45 g de NaCl (1,8 %).

On travaille à une hydratation de 60 %, hydratation classique d'une pâte boulangère. Le pétrissage s'effectue en deux temps, un temps de frasage à 30 rpm durant 2 min, puis un temps de pétrissage durant 23 min à 52,5 rpm. La cuve de pétrissage est thermostatée à  $20\text{ °C}$ .

Lors des essais réalisés en présence de glucose oxydase (GOX), une hydratation de 55 % a été choisie. La recette de pétrissage est la suivante :

- 2584 g de farine ;
- 1416 g d'eau distillée (55 %) ;
- 46,5 g de NaCl (1,8 %).

#### **3.2.1.2 Au bioréacteur**

L'eau distillée est maintenue dans un bain marie à  $30\text{ °C}$ .

La recette utilisée pour l'ensemble des pétrissages réalisés est la suivante :

- 325 g de farine ;
- 227,5 g d'eau (70 %) ;
- 6,5 g de NaCl (2 %).

Le moteur n'étant pas assez puissant, les pâtes sont systématiquement sur hydratées.



Le pétrissage se déroule selon le protocole suivant. L'eau distillée contenant le NaCl préalablement dissous, puis la farine sont introduites dans le bol du pétrin. L'acquisition des données est lancée à partir du moment où les ingrédients sont en contact. L'étanchéité de la cuve est alors réalisée rapidement pendant une durée la plus répétable possible (2 min) puis le moteur est mis en marche. Le pétrissage dure 60 mi avec une vitesse du frasseur fixée à 200 rpm.

### **3.2.1.3 Congélation des pâtes**

En fin de pétrissage (ou à intervalle de temps 5-10-15-20-25 dans le cas des cinétiques au sitoxygraphe), le pétrin (bioréacteur ou sitoxygraphe) est arrêté et un échantillon de pâte est prélevé, congelé dans l'azote liquide ( $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), concassé dans un mortier puis conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans des sacs plastiques hermétiques et à l'abri de la lumière.

## **3.2.2 Dosages biochimiques (farine et pâtes)**

### **3.2.2.1 Activités enzymatiques extractibles**

4 g de farine sont homogénéisés dans 10 mL de tampon sodium phosphate ( $\text{pH} = 7,5$ ) à 0,1 M dans un bain de glace pilée avec un homogénéisateur de type ultra-turrax pendant 15 s, suivi de 30 s de repos, puis de nouveau 15 s d'homogénéisation. L'extrait est ensuite centrifugé à 30000 g pendant 20 min à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant maintenu à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans un bain de glace est directement utilisé pour la mesure de l'activité LOX extractible. Les activités CAT et POD sont mesurés sur des extraits dilués au  $\frac{1}{8}$  dans le même tampon. Dans le cas des dosages d'activités enzymatiques sur les pâtes, la masse de pâte pesée est adaptée en fonction de l'hydratation de la pâte de façon à extraire les activités enzymatiques à partir d'une quantité de matière sèche équivalente à celle de la farine.

Toutes les activités enzymatiques résultent d'une moyenne de quatre dosages (deux mesures) sur deux extraits enzymatiques.

#### **3.2.2.1.1 Activité lipoxygénasique**

L'activité LOX est déterminée par polarographie selon la méthode décrite par Boussard *et al.* (2004). Un volume de 1,5 mL de substrat, mélange d'acide linoléique - Tween 20 dans un rapport molaire 4 : 1 dispersé dans un tampon phosphate (0,1 M à  $\text{pH} = 6,5$ ) est saturé par



de l'air à 30 °C. L'enregistrement débute après l'ajout de 50 à 100 µL d'extrait enzymatique. L'activité extractible de LOX est exprimée en nanokatals (nkat, c'est-à-dire en nmoles d'oxygène consommé par seconde) par gramme de matière sèche dans les conditions de l'expérience.

### 3.2.2.1.2 Activité peroxydasique

L'activité peroxydasique (POD) est déterminée par spectrophotométrie (Garcia *et al.*, 2002a) basée sur la diminution de l'absorbance à 310 nm d'une solution d'acide férulique mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diodes. Le mélange réactionnel est composé d'acide férulique (0,1 mM), de CaCl<sub>2</sub> (20 mM) et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) dans du tampon acétate (0,1 M à pH = 5,6). La réaction a lieu à 25 °C et démarre lors de l'addition de 25 µL d'extrait enzymatique convenablement dilué. L'activité est déterminée par le calcul de la pente initiale de la chute d'absorbance à 310 nm. Dans ces conditions, le coefficient d'extinction molaire de l'acide férulique est de 8400 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. L'activité est exprimée en microkatals (µkat, c'est-à-dire en µmole d'AF consommé par seconde) par gramme de matière sèche.

### 3.2.2.1.3 Activité catalasique

Dosée par polarographie, la mesure de l'activité catalasique se fait à pH = 7 (tampon phosphate 0,1 M) et le substrat est le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 M. L'activité catalasique est exprimée en µmol d'O<sub>2</sub> produit par seconde (µkat) et est ramenée par gramme de matière sèche.

### 3.2.2.1.4 Activité glucose oxydasique

Le dosage est réalisé à 30 °C dans un milieu réactionnel de volume final de 1,5 mL constitué de tampon acétate 0,1 M à pH = 5,6 contenant du glucose 0,22 M. L'extrait enzymatique est ajouté au volume réactionnel et l'activité GOX déterminée par la mesure de la pente de la droite représentant la consommation d'O<sub>2</sub>. Elle est exprimée en nkatals. L'activité ajoutée dans les pâtes supplémentées en GOX est de 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms (activité optimale déterminée par Garcia, 2000).

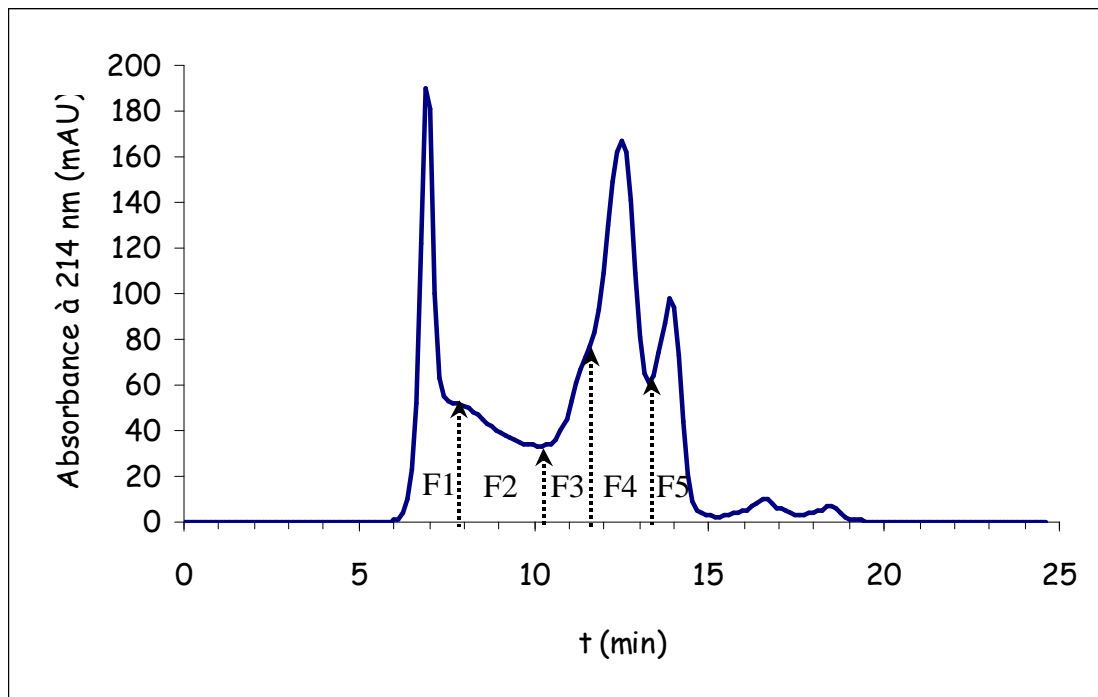


Figure 55. Profil d'éluion des protéines de la farine BPMF.

### **3.2.2.2 Etat d'agrégation des protéines**

La procédure expérimentale est adaptée du protocole mis au point par Morel *et al.* (2000b) sur la farine et par Malet (2005) sur la pâte.

#### 3.2.2.2.1.1 Extraction des protéines solubles au dodécyl sulfate de sodium

L'extraction des protéines est réalisée sur un échantillon de 160 mg de farine ou 300 mg de pâte dans 20 mL de tampon phosphate 0,1 M à pH 6,9 contenant 1 % de SDS (rapport poids/volume). Après avoir été homogénéisés quelques secondes, les contenus des tubes sont maintenus pendant 80 min sous agitation douce dans une étuve à 60 °C pour stabiliser l'extrait (inactivation des protéases) (Morel *et al.*, 2000b).

#### 3.2.2.2.1.2 Extraction des protéines non solubles au SDS

Afin de solubiliser les macropolymères gluténiques, les échantillons sont soumis un traitement ultrasonore à une puissance de 7 W pendant 90 s. L'échantillon est centrifugé durant 20 min à 30 000 g et à 10 °C, afin de séparer les protéines extraites (surnageant) du culot d'amidon principalement. Le surnageant est filtré (filtre Milex-GV, PVDF 0,22 µm, Millipore®), puis les protéines sont analysées par HPLC-SE.

#### 3.2.2.2.1.3 Séparation et caractérisation des protéines par SE-HPLC

La séparation est réalisée d'après les conditions utilisées par Malet (2005) adaptées de celles de Darde (2001) et Morel *et al.* (2000b). 20 µL d'extrait de protéines de farine (30 µL dans le cas des pâtes) sont injectés sur une colonne (300 x 7,5 mm) d'exclusion stérique analytique composée d'un gel de silice rigide hydrophobe (TSK G 4000, Toyosoda, Stuttgart Allemagne). L'élution réalisée avec une solution de tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH = 6,9) contenant 0,1 % de SDS, à un débit est de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> à 30 °C.

Le détecteur à barrette de diodes permet de travailler dans un gamme de longueurs d'onde entre 200 et 900 nm. Les liaisons peptidiques sont détectées à 214 nm et le chromatogramme obtenu peut être découpé en cinq fractions (figure 55). La somme des cinq fractions correspond à la quantité totale ( $F_T$ ) de protéines solubles. La délimitation du pic F1 et du pic F3 sont données par les formules VII et VIII respectivement. Les temps de fin de pic dépendent de l'écart entre les sommets des pics F1 et F4.



**Tableau 15. Correspondance entre les fractions protéiques séparées par gel filtration et les masses moléculaires.**

| <b>Fraction</b> | <b>Protéines</b>                             | <b>Masse moléculaire (kDa)</b> |
|-----------------|--|--------------------------------|
| F1              | Gluténines de Haut poids moléculaire (HPM)   | 2000 à 630                     |
| F2              | Gluténines de Faible poids moléculaire (FPM) | 630 à 116                      |
| F3              | Gliadines ( $\omega$ )                       | 116 à 65                       |
| F4              | Gliadines ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )  | 65 à 21                        |
| F5              | Albumines, globulines                        | < 21                           |

$$(VII) \quad (t_{RF4}-t_{RF1}) \times 0,09 + t_{RF1}$$

Avec  $t_R$ : temps de rétention en min.

$$(VIII) \quad (t_{RF4}-t_{RF1}) \times 0,79 + t_{RF1}$$

Dans ces conditions, Morel *et al.* (2000a) ont déterminé les correspondances entre les fractions et les poids moléculaires (tableau 15). Dans nos résultats, les valeurs utilisées sont exprimées en quantité absolue ramenée à la matière sèche de l'échantillon (UA. $\mu\text{g}^{-1}$  ms).

Dans le cadre de l'étude variétale, nous avons défini des paramètres issus des fractions quantifiées :

- la quantité totale de gluténines (F1 + F2) ;
- la quantité totale de gliadines (F3 + F4) ;
- le rapport gliadines sur gluténines (F3 + F4) / (F1 + F2) ;
- le rapport gluténines HPM sur gluténines FPM (F1/F2).

### **3.2.2.3 Dosages des lipides**

#### **3.2.2.3.1 Cartographie lipidique**

La procédure expérimentale tient compte de la masse de matière sèche de l'échantillon (farine et pâte). Le dosage des lipides est adapté de la méthode de Tsen et Hlynka (1962).

##### 3.2.2.3.1.1 Extraction des lipides

La phase d'extraction se déroule à froid afin de bloquer l'activité des enzymes susceptibles de dégrader les lipides. Les lipides sont extraits à partir d'un échantillon d'environ 10 g de farine ou 16 g de pâte, masse de matière humide, auxquels sont ajoutés successivement, 200  $\mu\text{L}$  d'acide acétique afin d'acidifier le milieu pour rompre les liaisons entre protéines et lipides, 20 mL de méthanol pour solubiliser les lipides et les protéines, 1 mL de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) contenant 0,01 % de Butyl HydroxyToluène (BHT) pour son rôle antioxydant, deux fois 9 mL de  $\text{CHCl}_3$  pour séparer les lipides des protéines, puis on ajoute une quantité d'eau salée de façon à obtenir 1 % de NaCl dans la phase aqueuse finale de 20 mL. Cette dernière tient compte de l'eau apportée par l'échantillon. Entre chaque

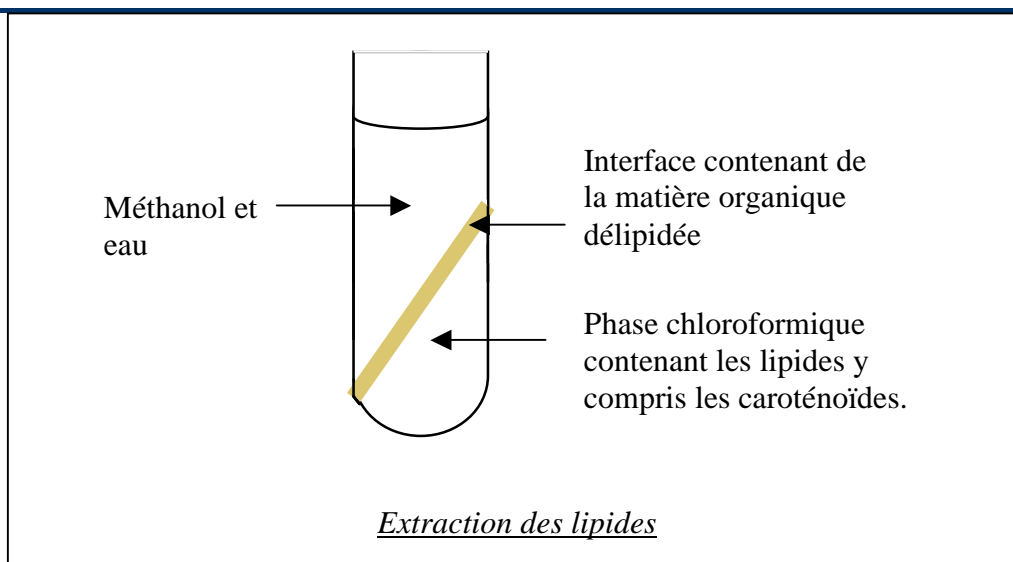


Figure 56. Séparation de la phase chloroformique lipidique par centrifugation

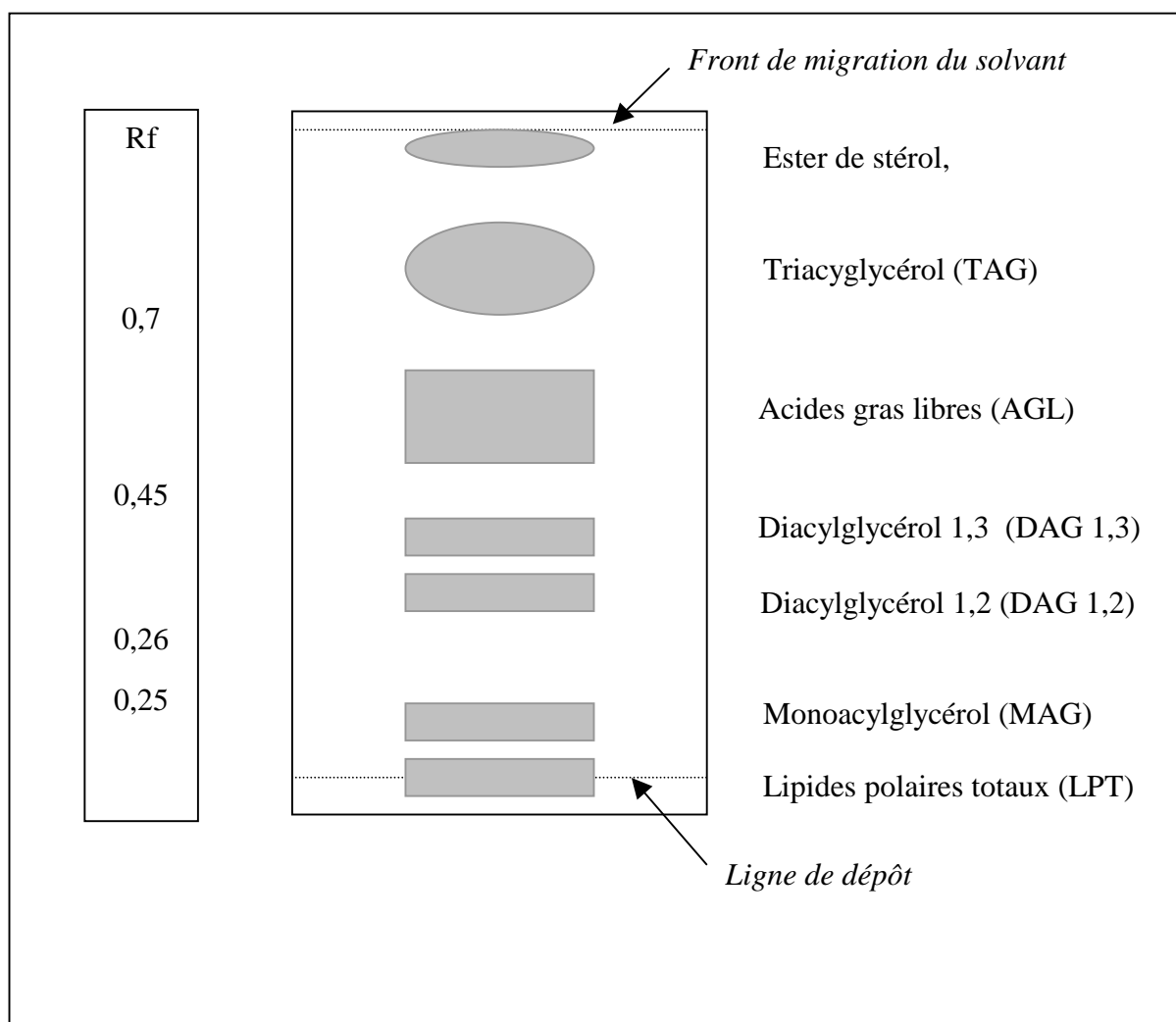


Figure 57. Schéma du fractionnement des lipides neutres par chromatographie sur couche mince (gel de silice).  
Éluant : éther de pétrole / éther diéthylique / acide formique (70/30/1)

incorporation, le solvant est homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-turrax T25), durant 20 s à environ 3000 rpm. La tige de l'ultra-turrax T25 est rincée avec 1 mL de  $\text{CHCl}_3$ .

Le mélange est centrifugé durant 20 min à 13000 g et à 4 °C. On prélève alors 10 mL de la phase chloroformique (figure 56) contenant les lipides et les caroténoïdes pour les transférer dans un récipient hermétique.

### 3.2.2.3.1.2 Fractionnement des lipides par chromatographie sur couche mince

Les étalons internes, 10  $\mu\text{L}$  d'acide margarique  $\text{C}_{17}$  ( $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) et 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{triC}_{17}$ , sont ajoutés à 4 échantillons d'extrait lipidique de 250  $\mu\text{L}$  chacun. Les échantillons sont concentrés au Rotavapor à 37 °C, puis resolubilisés deux fois successives dans 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$ , et enfin déposés sur une plaque de silica-gel préalablement activée à l'étuve. La séparation de lipides neutres est réalisée en une heure (figure 57), à l'aide d'un éluant constitué d'un mélange de 70 mL d'éther de pétrole, 30 mL d'éther diéthylique, et de 1 mL d'acide formique.

Après pulvérisation d'une solution de primuline (0,01 % dans un mélange acétone/eau, 80/20) sur la plaque, les différentes fractions de lipides sont révélées sous UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).

### 3.2.2.3.1.3 Quantification des lipides par chromatographie en phase gazeuse

Après identification (figure 57), chaque fraction lipidique est prélevée. 10  $\mu\text{L}$  d'étalon interne (acide margarique  $\text{C}_{17}$  à  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) sont ajoutés dans les fractions de diacylglycérol et de monoacylglycérol, et 30  $\mu\text{L}$  dans la fraction de lipides polaires totaux. Dans le cadre de l'étude variétale, seules les fractions monoacylglycérols (MAG) et acides gras libre (AGL) ont été analysées.

Les fractions lipidiques sont ensuite saponifiées et méthylées en présence de 5 mL de méthanol  $\text{BF}_3$  après incubation de 15 min dans un bain-marie à 65 °C. Les esters méthyliques d'acides gras sont alors extraits avec un mélange de 2 mL d'eau et de 4 mL de pentane. Les échantillons sont homogénéisés puis laissés quelques minutes à décanter. La phase pentanique (supérieure) contenant les lipides est prélevée puis, le pentane est évaporé dans un bain thermostaté de 40 °C sous un flux d'azote.

Les esters méthyliques sont ensuite resolubilisés et concentrés dans 100  $\mu\text{L}$  d'heptane pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse.



Le système chromatographique utilisé est constitué d'un injecteur « split » contenant un « insert » chauffé à 250 °C, d'une colonne capillaire (DB WAX, 30 m de long, 0,25 mm de diamètre intérieur) maintenue à 195 °C, et d'un détecteur à ionisation de flamme chauffé à 250 °C.

Les différents acides gras méthylés sont séparés en 10 min en utilisant l'hydrogène comme gaz vecteur dont la pression en tête de colonne est fixée à 13,5 psi. Le volume d'injection de l'extrait est de 1 µL.

L'identification des différents acides gras est obtenue en comparant leur temps de rétention avec celui d'un mélange étalon. La quantification se fait en comparant les surfaces des pics avec celui de l'étalon interne, l'acide margarique C<sub>17</sub>.

### 3.2.2.3.2 Dosage des pigments caroténoïdes

Les caroténoïdes extraits de la farine ou des pâtes sont dosés par spectrophotométrie. Pour les farines, le spectre d'absorption de l'extrait lipidique (en phase chloroformique) est enregistré entre 380 et 750 nm. L'absorbance expérimentale à 455 nm est corrigée de la part d'absorbance due à la turbidité (mesurée entre 550 et 750 nm) afin de déterminer la quantité de pigments caroténoïdes présente dans l'extrait lipidique.

$$(IX) \quad \text{Abs}_{\text{corr } 455 \text{ nm}} = \text{Abs}_{455 \text{ nm}} - \text{Turbidité}_{455 \text{ nm}}$$

$$(X) \quad \text{Turbidité}_{455 \text{ nm}} = e^{a \log \lambda_{455 \text{ nm}} + b}$$

Avec, a et b coefficients de régression linéaire de la droite  $\log(\text{Abs}) = f(\log(\lambda))$  entre 550 et 750 nm.

Les teneurs en caroténoïdes sont ensuite exprimées en tenant compte de la quantité de matière mise en œuvre à partir de la relation (XI) :

$$(XI) \quad \text{Quantité de caroténoïdes} = \frac{Ab_{\text{Scorr}455\text{nm}}}{m} \times 1000$$

avec ,

quantité de caroténoïdes exprimées en mUA .g<sup>-1</sup> ms

m : masse de matière sèche

**Tableau 16. Longueur d'onde spécifique et coefficient d'extinction molaire des substrats redox utilisés pour mesurer l'activité laccasique au spectrophotomètre à pH 4 et 5,6.**

| substrat | $\lambda$ en nm | $\epsilon$ en $M^{-1}.cm^{-1}$ | référence                |
|----------|-----------------|--------------------------------|--------------------------|
| AF       | 320             | 8400                           | Garcia, 2000             |
| AS       | 309             | 8400                           |                          |
| ABTS     | 405             | 36000                          | Childs et Bardsley, 1975 |

### **3.2.3 Caractérisation des extraits de laccase**

#### **3.2.3.1 Dosage de l'activité laccasique à pH = 4 et pH = 5,6**

##### **3.2.3.1.1 Dosage polarographique**

Un volume de 1,4 mL de solution de substrat phénolique préparé dans du tampon acétate 0,1 M est saturé en oxygène ( $[O_2] = 225 \mu\text{M}$ ) par bullage d'air à 30 °C, est placée dans la cuve du polarographe. La réaction démarre lors de l'ajout d'un volume adéquat d'extrait de laccase. L'activité laccasique est exprimée en nanokatals (nkat, c'est-à-dire en nmoles d'oxygène consommé par seconde et par mL d'extrait dans les conditions de l'expérience). Elle est déterminée par la mesure de la pente initiale de la courbe de consommation d' $O_2$ , les produits d'oxydation pouvant être substrats de l'enzyme. Le dosage polarographique est peu précis pour la mesure des activités inférieure à 0,3 nkat en cuve. Chaque activité laccasique mesurée au polarographe a été réalisée dans le domaine de linéarité de l'appareil. Ainsi, les enzymes trop concentrées ont été diluées au 1/10 avec le tampon de réaction quand cela était nécessaire, l'activité mesurée n'étant plus proportionnelle à la quantité d'enzyme au-delà de 2 nkat en cuve.

##### **3.2.3.1.2 Dosage spectrophotométrique**

Le matériel utilisé est un spectrophotomètre à barrette de diodes Hewlett-Packard (HP84 52 A). Contrairement à la polarographie, la spectrophotométrie permet de mesurer la cinétique de consommation des acides phénoliques pour de très faibles activités. En revanche, le domaine des mesures est limité par la concentration maximale en substrat (absorbance initiale trop élevée). Dans le cas de l'acide férulique, la concentration maximale ( $[AF]_{\text{max}}$ ) est égale à 0,1 mM (absorbance égale à 1,5).

La solution (tampon acétate 0,1 M) de substrat est thermostatée à 30 °C et mise à buller en continu. Un volume de 3 mL est déposé dans une cuve en quartz. La réaction est amorcée par l'addition de 30  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique au mélange réactionnel. Après homogénéisation rapide du milieu, la cuve est immédiatement placée dans le spectrophotomètre.

La pente initiale de la courbe donne la vitesse initiale de disparition du substrat, exprimée en  $\text{nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'extrait. Les coefficients d'extinction molaire utilisés sont regroupés dans le tableau 16 pour les différents substrats étudiés.



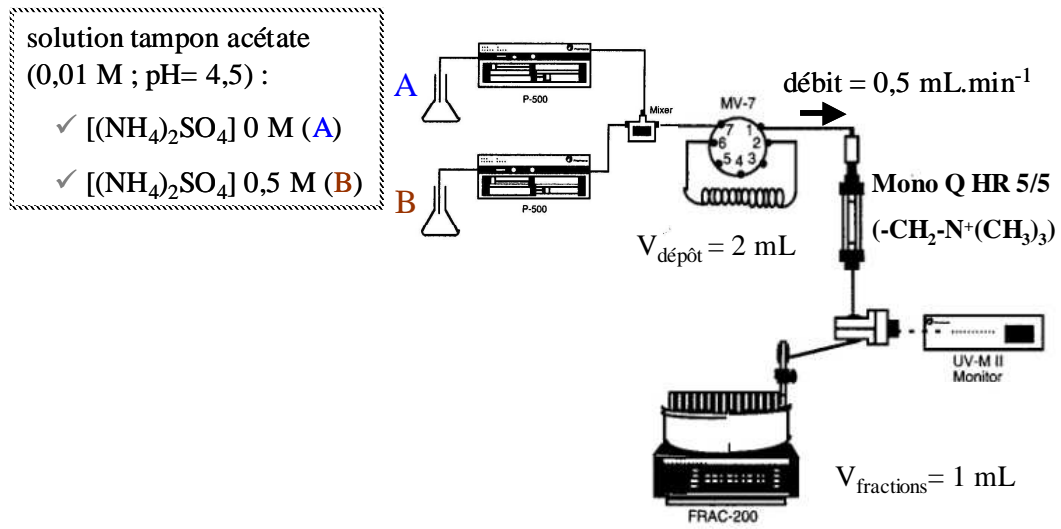


Figure 58. Schéma de principe et conditions expérimentales de la chromatographie échangeuses d'anions couplé au système FPLC

### **3.2.3.2 Purification**

#### **3.2.3.2.1 Chromatographie échangeuse d'ions**

Pour purifier de petits volumes de laccase PC (2 mL), la colonne utilisée est une colonne échangeuse d'anions Mono Q<sup>®</sup> HR 5/5 (Pharmacia biotech<sup>®</sup>) d'une capacité de 1 mL. Les conditions de purification sont adaptées de Sigoillot *et al.* (2003) et Record *et al.* (2002).

La colonne est placée dans un système FPLC (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>), piloté par un logiciel « FPLC director » (figure 58). Le système, muni d'un détecteur UV, permet de mesurer en continu l'absorbance à 280 nm. La purification est réalisée sur un volume de 2 mL d'extrait enzymatique brut dialysé préalablement contre une solution de tampon acétate 10 mM à pH = 4,5 (solution A).

Après le dépôt, la colonne est lavée par 15 volumes de colonne de solution A et les protéines restées fixées sont éluées avec un gradient linéaire de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0 à 0,33 M préparé dans la solution A. Le débit utilisé est de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Nous avons préféré le sulfate d'ammonium au NaCl généralement utilisé (Otterbein *et al.*, 2000 ; Record *et al.*, 2002 ; Sigoillot *et al.*, 2003) car ce dernier est inhibiteur de l'activité laccasique (Garzillo *et al.*, 1998 ; Johannes et Majcherczyk, 2000a). L'utilisation du NaCl lors d'essais préliminaires a conduit à un rendement nettement plus faible, confirmant l'inhibition de l'activité de la laccase par les ions Cl<sup>-</sup>. Des fractions de 1 mL sont collectées sur lesquelles sont déterminées l'activité laccasique (par polarographie) et l'absorbance à 280 nm.

#### **3.2.3.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Le système électrophorétique utilisé est le PhastSystem (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>). Deux types d'électrophorèse ont été réalisées sur l'extrait PC :

- une isoélectrofocalisation (IEF) permettant la séparation des protéines dans un gradient de pH en fonction de leur point isoélectrique (pI) ;
- une électrophorèse SDS-PAGE (mode dénaturant) pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

L'IEF est réalisée en utilisant un « PhastGel IEF 3-9 » qui couvre une gamme de pH allant de 3 à 9. La séparation a été réalisée à 15 °C, un total de 500 V.h est appliqué lors de l'expérience. La calibration du gel est effectuée avec un kit de marqueurs protéiques de pH allant de pH 3 à 9. La révélation des protéines est effectuée par une solution de coloration au bleu de Coomassie (PhastGel Blue R) préparée extemporanément dans un mélange méthanol



(30 %), acide acétique (10 %) et CuSO<sub>4</sub> (0,1 %) dans l'eau selon un protocole fourni par le fabricant.

L'électrophorèse en mode SDS-PAGE est réalisée avec un « PhastGel gradient 10-15 » permettant une séparation des protéines de masse moléculaire comprises entre 10 et 250 kDa. La calibration du gel est effectuée avec le kit de marqueurs de poids moléculaire *LMW electrophoresis calibration kit* fourni par Pharmacia Biotech<sup>®</sup>. Une révélation non spécifique au bleu de Coomassie est effectuée comme dans le cas de l'IEF selon la procédure du fabricant. De plus, nous avons aussi effectué une coloration spécifique en utilisant l'ABTS (acide 2,2'-Azino-Bis (3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)). L'ABTS est un substrat spécifique de la laccase qui est de couleur vert-bleu sous sa forme oxydée. Pour cette révélation spécifique, le gel de polyacrylamide est plongé dans une solution d'ABTS 2 mM (tampon acétate 0,1 M pH = 4) et les bandes contenant l'activité laccasique se colorent en quelques secondes.

### **3.2.3.3 Dosages des protéines**

Lors du stage de Master d'A. Jeanneau (2005), le dosage de protéines de l'extrait de laccase PC a été réalisé selon plusieurs méthodes : méthode de Bradford (micro) et méthode à l'acide bicinchoninique (BCA, PIERCE<sup>®</sup>) (Smith *et al.*, 1985). La conclusion des différents dosages est qu'aucune des méthodes d'estimations du taux de protéines que nous avons utilisées n'est exempte d'interférences. En effet, la présence de composés phénoliques dans l'extrait peut conduire à des sous-estimations lors du dosage par la méthode du micro Bradford. Dans le cas de la méthode BCA, l'acide bicinchoninique réagit avec un ion Cu<sup>+</sup>, formé après réduction de l'ion Cu<sup>2+</sup> par les protéines en milieu basique. Lors de l'oxydation par l'enzyme, les atomes de cuivre composant le site actif de l'enzyme sont successivement réduits, puis oxydés (passage d'une forme réduite à oxydée de l'enzyme). La présence du cuivre apporté par la laccase peut perturber le dosage des protéines dans la méthode utilisant le BCA comme indicateur coloré.

Par conséquent, les résultats présentés sont issus d'un dosage protéique au moyen de la méthode de micro Bradford, méthode qui semble être la moins perturbée. Le kit de dosage est fourni par la société Bio Rad<sup>®</sup> et permet de doser des protéines sur une gamme de 1 à 20 µg.mL<sup>-1</sup> de protéines. La courbe d'étalonnage est réalisée avec la sérum albumine bovine (BSA).

**Tableau 17** Conditions chromatographiques pour l'analyse de l'oxydation des mélanges de composés phénoliques oxydés par PC.

| <b>Eluant<br/>(phase mobile)</b>   | <b>Mélange</b>  | <b>Débit<br/>(mL/min)</b> | <b>V<sub>injecté</sub><br/>(<math>\mu</math>L)</b> | <b><math>\lambda</math><sub>Détection</sub><br/>(nm)</b> |
|--|-----------------|---------------------------|--|--|
| 20 % NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM (pH = 2,5)<br>80% acétonitrile | AF/AS<br>pH = 4 | 0,8                       | 20   | 280  |

### **3.2.4 Mesure de l'oxydation des phénols en milieu modèle par la laccase PC**

En milieu modèle, la mesure de l'oxydation des phénols a été réalisée à la fois par dosage de l'O<sub>2</sub> consommé (polarographie) et par dosage des composés phénoliques (substrat et produit) après séparation chromatographique et détection UV.

Le dosage polarographique est identique à celui décrit dans la paragraphe « dosage de l'activité laccasique ». L'analyse des composés phénoliques du milieu est réalisé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse. L'appareil CLHP est constitué d'un ensemble Workstation (VARIAN, les Ulis, France) comportant une pompe (9012), un injecteur Vici<sup>®</sup> et un détecteur UV (9050). La colonne utilisée est une C<sub>18</sub> (YMCODS AQ, AIT, France) dont les dimensions sont de 150 × 4,6 mm et la granulométrie de 3 µm. Le système chromatographique est ponctuellement relié à un détecteur à barrette de diodes pour l'identification des composés à l'aide des spectres UV.

Les conditions expérimentales pour chaque série de mélanges sont regroupées dans le tableau 17. La quantification des composés est réalisée par étalonnage externe.

### **3.2.5 Analyse de données et méthode des plans d'expériences**

La méthode des plans d'expériences est une technique d'organisation optimale des expériences de manière à obtenir un maximum d'informations en un minimum d'essais avec la meilleure précision possible (Goupy, 2000). Le point de départ de cette méthode est l'espace expérimental défini par les facteurs (paramètres) mesurés. Dans cet espace, un domaine d'étude est défini. A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse (grandeur d'intérêt). A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses.

L'utilisation d'un modèle mathématique *a priori* permet ensuite d'analyser les interactions entre facteurs et réponses dans l'ensemble du domaine à partir des données expérimentales. Dans ce manuscrit, les effets de trois paramètres de pétrissages (vitesse, hydratation, température) ont été étudiés, à partir d'un plan composite à trois facteurs et cinq niveaux aboutissant à un modèle polynomial du second degré.

Tableau 18. Matrice d'expériences en valeurs centrées réduites des facteurs étudiés. X1, Vitesse de rotation du bras ; X2, Hydratation de la pâte ; X3, Température initiale des ingrédients

| Essais | X1        | X2        | X3        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1      | -1        | -1        | -1        |
| 2      | +1        | -1        | -1        |
| 3      | -1        | +1        | -1        |
| 4      | +1        | +1        | -1        |
| 5      | -1        | -1        | +1        |
| 6      | +1        | -1        | +1        |
| 7      | -1        | +1        | +1        |
| 8      | +1        | +1        | +1        |
| 9      | $-\alpha$ | 0         | 0         |
| 10     | $+\alpha$ | 0         | 0         |
| 11     | 0         | $-\alpha$ | 0         |
| 12     | 0         | $+\alpha$ | 0         |
| 13     | 0         | 0         | $-\alpha$ |
| 14     | 0         | 0         | $+\alpha$ |
| 15     | 0         | 0         | 0         |
| 16     | 0         | 0         | 0         |
| 17     | 0         | 0         | 0         |
| 18     | 0         | 0         | 0         |
| 19     | 0         | 0         | 0         |
| 20     | 0         | 0         | 0         |
| 21     | 0         | 0         | 0         |
| 22     | 0         | 0         | 0         |

### **3.2.5.1 Obtention des valeurs centrées réduites**

Pour centrer et réduire les valeurs des facteurs, un changement de repère et d'origine est opéré. Le passage de la valeur réelle à la valeur centrée réduite se fait selon la relation XII :

$$(XII) \quad X = \frac{x - x_0}{\Delta x}$$

Avec,

$X$  : valeur centrée réduite du facteur étudié (sans unité)

$x$  : valeur réelle du facteur étudié (en unité mesurée)

$x_0$  : valeur réelle mesurée au milieu du domaine expérimental (en unité mesurée) qui correspond à l'origine choisie pour la valeur réduite du paramètre.

$\Delta x$  : pas de variation choisi, différence entre les niveaux +1 et 0 (en unité mesurée)

### **3.2.5.2 Choix du critère d'optimalité et établissement de la matrice d'expériences**

Nous avons choisi comme critère d'optimalité l'isovariance par rotation pour que les réponses calculées avec le modèle issu du plan aient une erreur de prévision identique pour des points situés à la même distance du centre du domaine d'étude. La matrice d'expériences en valeurs centrées réduites est présentée dans le tableau 18. Dans le cas d'une étude à trois facteurs, la valeur de  $\alpha = 1,682$  est déterminé par la relation XIII :

$$(XIII) \quad \alpha = \left( 2^n \right)^{1/4}$$

Avec,

$\alpha$  : niveau limite supérieur du facteur centré réduit

$n$  : nombre de facteurs (dans notre cas,  $n = 3$ )



**Tableau 19. Domaine expérimental du plan d'expériences utilisé**

| <b>Valeurs centrées<br/>réduites des facteurs</b>                          | <b>-1,682</b> | <b>-1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>1,682</b> |
|--|---------------|-----------|----------|----------|--------------|
| <b>X<sub>1</sub></b><br><b>(vitesse de rotation du<br/>fraseur en rpm)</b> | 30            | 39        | 52,5     | 66       | 75           |
| <b>X<sub>2</sub></b><br><b>(hydratation en %)</b>                          | 57            | 58,2      | 60       | 61,8     | 63           |
| <b>X<sub>3</sub></b><br><b>(température des<br/>ingrédients en °C)</b>     | 10            | 12        | 15       | 18       | 20           |

Ce plan permet de modéliser les résultats selon un modèle linéaire dans lequel les coefficients correspondent aux effets simples et quadratiques de chaque paramètre et à l'ensemble de leurs interactions (relation XIV).

$$(XIV) \quad Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 \\ + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \\ + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{123}X_1X_2X_3 + \varepsilon$$

Avec,

$Y$  : valeur de la réponse expérimentale

$b_0$  : moyenne ou valeur au centre du domaine expérimental

$b_1$  : effet linéaire de la vitesse ;  $b_2$  : effet linéaire de l'hydratation,  $b_3$  : effet linéaire de la température initiale des ingrédients

$b_{12}$  : effet d'interaction entre la vitesse et l'hydratation

$b_{13}$  : effet d'interaction entre la vitesse et la température initiale des ingrédients

$b_{23}$  : effet d'interaction entre l'hydratation et la température de départ des ingrédients

$b_{11}$  : effet quadratique de la vitesse

$b_{22}$  : effet quadratique de l'hydratation

$b_{33}$  : effet quadratique de la température initiale des ingrédients

$b_{123}$  : interaction entre les trois facteurs

$X_1, X_2, X_3$  : niveaux respectifs de la vitesse de pétrissage, de l'hydratation et de la température initiale des ingrédients (valeurs centrées réduites)

$\varepsilon$  : erreur du modèle

Toutes les expériences de ce plan ont été réalisées au sitoxygraphe en mesurant en continu la teneur en oxygène au sein de la cuve. Le modèle établi n'est valable que dans le domaine expérimental (tableau 19). Les réponses ( $Y$ ) étudiées sont :

- la quantité totale d'O<sub>2</sub> consommée par la pâte après 25 min de pétrissage ( $Y_{O2tot}$ ) et
- les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> ( $Y_{ViO2}$ ).



## 4 RESULTATS ET DISCUSSIONS



#### **4.1 Mise au point du sitoxygraphe**

Depuis les années 1990, la Chaire de Biochimie Industrielle et Agroalimentaire du Cnam aborde l'étude des réactions d'oxydoréduction intervenant dans la pâte lors du pétrissage par une voie originale : la mesure directe des échanges gazeux d'une pâte pétrie avec son atmosphère environnante. Sur les aspects d'échanges gazeux, la mise au point du sitoxygraphe s'inscrit pleinement dans la lignée des travaux effectués jusqu'à présent.

Ces travaux de recherches ont rendu possible la quantification de l'oxygène consommé par la pâte au cours du pétrissage lors de la mise au point d'un pétrin bioréacteur, poursuivant de manière plus précise les travaux entamés en 1957 par Smith et Andrews (1957). Ce pétrin expérimental, rendu étanche, met en œuvre jusqu'à 600 g de pâte environ, permettant ainsi de mesurer les variations de pression partielle en oxygène au moyen d'une électrode de Clark (Ameille *et al.*, 2000b) dans l'atmosphère isolée environnant la pâte au cours du pétrissage. Par la suite, un appareil de mesure de gaz a été mis en place pour mesurer comme précédemment les teneurs en oxygène par une mesure électrochimique ainsi que les teneurs en CO<sub>2</sub> par infra-rouge dans l'enceinte isolée du pétrin (Celhay, 2000).

Actuellement, l'air contenu dans la cuve du pétrin circule à un débit de 110 L.h<sup>-1</sup> environ dans l'analyseur de gaz. Il est tout d'abord asséché par condensation de la vapeur d'eau qu'il contient à travers un point froid, puis filtré à travers un filtre 0,2 µm. Nous considérerons que l'analyse des gaz est non destructrice puisque seule une très petite quantité d'oxygène est consommée (réduite) au niveau de l'électrode et une faible quantité de vapeur d'eau est piégée au niveau du point froid. En mesurant la consommation d'oxygène de la pâte, le bioréacteur a ainsi permis d'étudier l'impact des facteurs de pétrissage, l'effet d'hydrolases, d'oxydoréductases et de substrats redox (avec ou sans enzyme) et de discriminer des farines dans des conditions particulières de pétrissage (Ameille *et al.*, 2000a ; Ameille *et al.*, 2000b). En effet, l'échelle, la géométrie de la cuve, la forme des bras, les vitesses de rotation utilisées sont relativement éloignées des conditions de pétrissage de pétrins conventionnels. De plus, la limitation de puissance du moteur impliquent de travailler dans des conditions d'hydratations fortes (~70 g d'eau ajoutée à 100 g de farine humide).

Le premier objectif de ce travail de thèse concerne la transposition sur le sitoxygraphe du savoir-faire acquis au bioréacteur sur la mesure des échanges gazeux. Pour cela, l'étanchéité du système est la condition indispensable à l'observation des variations de teneur en gaz au sein de celui-ci. Dans un second temps, le volume du système étanche a été



déterminé, en effet, la connaissance du volume de gaz contenu dans la cuve est nécessaire pour quantifier les échanges. Enfin, le changement d'échelle, passage du stade laboratoire ( $V \sim 1,7$  L) au stade pilote ( $V \sim 10$  L) fait apparaître des facteurs qui ne peuvent plus être négligés. Dans le cadre de notre étude, il s'agit de l'inertie de la mesure et des variations de pression au sein de la cuve.

### **4.1.1 Quantification des échanges gazeux entre la pâte et l'atmosphère du pétrin : mesure de la consommation d'oxygène d'une pâte boulangère**

#### **4.1.1.1 *Étanchéité du système « pétrin - dispositif de mesure des gaz »***

Au sitoxygraphe, nous devons nous assurer de l'étanchéité du système afin de garantir des mesures fiables et précises des pourcentages gazeux ( $O_2$ ,  $CO_{2\text{ bt}}$  et  $CO_{2\text{ Ht}}$ ) ainsi que de la pression au sein de la cuve. D'une manière générale, les points critiques pour l'étanchéité sont les zones de contact entre deux pièces disjointes où l'étanchéité est assurée par la mise en place de joints toriques disposés sur le couvercle latéral et le hublot supérieur et de joints de téflon souples réalisant l'étanchéité au niveau des orifices prévus pour l'emplacement de divers capteurs. L'étanchéité du système de prélèvement est réalisée par le plaquage des pièces polies constituant le système, les unes sur les autres et leur maintien dans cette position par des ressorts comprimés au moyen de vis de serrage. La graisse de silicone parfait l'étanchéité et facilite le mouvement de rotation de l'une des pièces par rapport à l'autre. La partie tournante sur laquelle est monté le bras mobile constitue également une fuite potentielle. Sur cette partie mobile, l'étanchéité est réalisée par l'intermédiaire d'un jeu de joints toriques.

##### **4.1.1.1.1 Test en pression**

Au cours du test de maintien de la pression, la cuve vide est mise en surpression de 1 bar, qui serait selon notre estimation, une surpression réaliste, pouvant apparaître au sein de la cuve pendant le pétrissage d'une farine levurée. Après avoir fait l'étanchéité, la pression est mesurée à l'aide d'un manomètre (échelle : 0-1 bar, pas : 0,02 bar), le bras du moteur est mis en rotation à 50 rpm. Pendant 30 min, aucune diminution de pression n'est observée lorsque le système de prélèvement est en position extérieure ou en position intérieure. Deux simulations





de prélèvement de pâte ont alors été effectuées, la position de l'aiguille du manomètre varie alors entre 1 et 0,98 bar. Les simulations de prélèvement entraînent l'introduction d'un volume de 22 cm<sup>3</sup> d'air dans la cuve. Après quelques heures de maintien de la cuve en pression, une très légère diminution de pression apparaît (0,04 bar). Ce test est satisfaisant, le système semble donc suffisamment hermétique.

### 4.1.1.1.2 Quantification des échanges gazeux

Pour conforter ce résultat, nous quantifions les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur du pétrin lorsqu'il existe un fort gradient en O<sub>2</sub> entre l'intérieur et l'extérieur de la cuve. L'oxygène de l'atmosphère de la cuve est chassé par introduction d'azote U dans la cuve, puis l'étanchéité est réalisée et on laisse le système atteindre l'équilibre. Le pourcentage d'O<sub>2</sub> atteint est de 1,5 % (soit  $\Delta O_2 = 19,4$  %). La cuve est maintenue à la pression atmosphérique. Pendant toute la durée de l'expérience, le bras est mis en mouvement à 50 rpm.

Après 20 min (durée qui correspond à celle du pétrissage), le pourcentage d'O<sub>2</sub> dans la cuve est passé de 1,50 à 1,52 %. A la température du laboratoire voisine de 20 °C, à t = 0, nous avons dans la cuve dont le volume est égal à 9,83 L,  $n_{O_2} = \frac{9,83}{24,05} \times \frac{1,5}{100} = 6,131$  mmoles.

A t = 20 min, nous avons  $n_{O_2} = \frac{9,83}{24,05} \times \frac{1,52}{100} = 6,213$  mmoles. Ainsi, 82  $\mu$ moles d'O<sub>2</sub> sont donc entrées dans la cuve (1,3 %). Dans la suite des expérimentations, la plus faible teneur en oxygène que nous ayons à mesurer au sein du pétrin est de 10 % ( $\Delta O_2 = 10,9$  %), dans le cas de pâte en fermentation, ce qui réduit le débit de fuite. Etant données les conditions expérimentales de mesure de la fuite (grand volume de gaz et fort gradient), le système présente une étanchéité suffisante. Ainsi, dans la suite de cette étude, la variation de la teneur en O<sub>2</sub> dans la cuve due aux échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cuve est négligée. Ainsi :

- toute production ou consommation d'oxygène est due aux réactions chimiques et biochimiques ou à la présence de levure (*S. cerevisiae*) au sein de la pâte ;
- toute production de CO<sub>2</sub> est due à la présence de levure ou de systèmes microbiologiques endogènes ;
- dans le cas de pâte en fermentation, l'augmentation de pression au sein de la cuve correspond à la production de CO<sub>2</sub> par la levure.

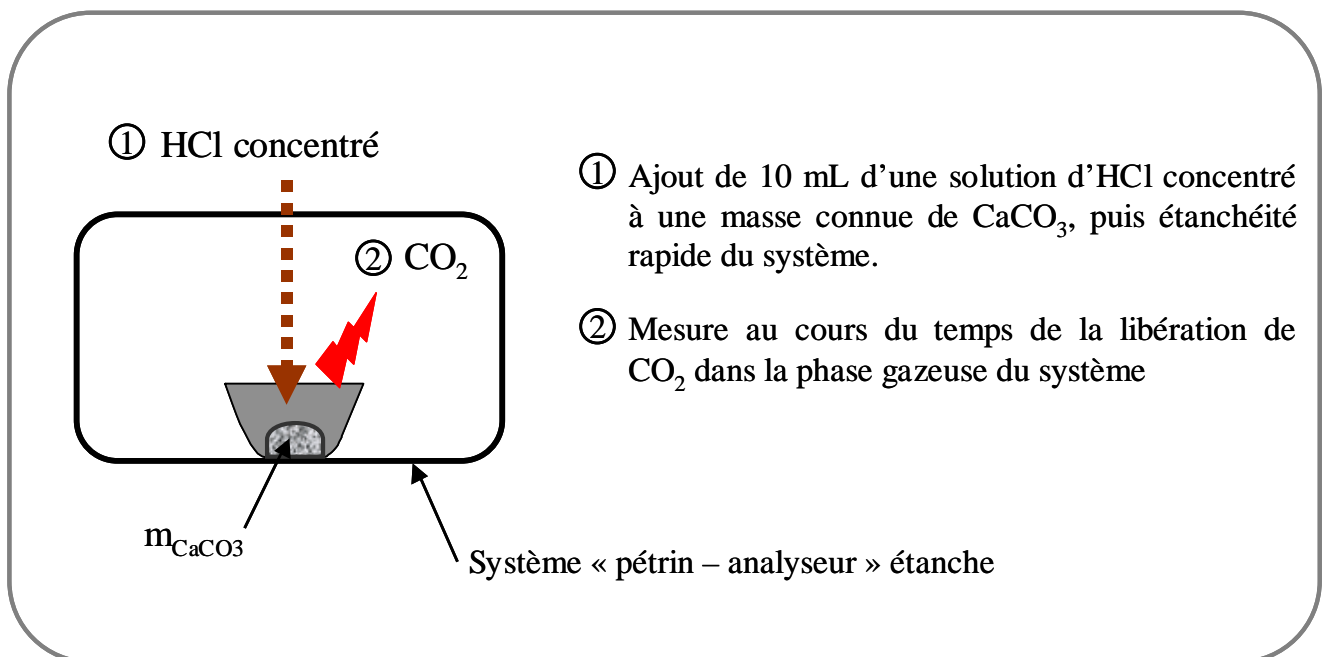


Figure 59. Principe de détermination du volume de l'enceinte du sitoxygraphe – analyseur de gaz

L'étanchéité de la cuve permet donc de garantir une mesure des échanges gazeux pâte-atmosphère dans l'enceinte confinée de la cuve du pétrin, image des réactions intervenant au cours du pétrissage, ainsi que d'estimer de façon la plus précise possible l'évolution de la pression réelle au sein de la cuve. L'étanchéité est donc la base des travaux sur les échanges gazeux. Celle-ci est vérifiée régulièrement au cours des expériences successives. Un autre paramètre très utile est le volume du système « pétrin – analyseur de gaz », car il permet :

- la transformation des teneurs en  $O_2$  et  $CO_2$  en moles à partir des pourcentages mesurés ;
- le calcul du Volume de gaz  $V_g$  dans la cuve à tout instant du pétrissage et par suite du volume de pâte. Cette partie du travail constitue par ailleurs une voie de développement de notre outil qui sera abordée dans le dernier chapitre de résultats.

### Extension de cette mesure dans le cas des expériences de prélèvements de pâte pendant le pétrissage :

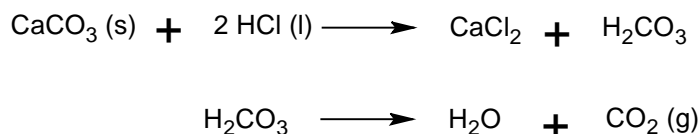
Après avoir créé un fort gradient d' $O_2$  entre l'atmosphère intérieure et l'extérieur du pétrin, la valeur du pourcentage d' $O_2$  affichée est de 1,52 %. A cet instant, deux prélèvements successifs ont été simulés, le pourcentage d' $O_2$  en cuve affiche alors 1,59 %. Après calcul, il est entré 0,39 mmoles d' $O_2$ , soit environ 6 % des moles présentes au départ dans la cuve. Lors du pétrissage, l'utilisation du système de prélèvement implique l'introduction du volume d'air dans la cuve du pétrin. Donc, un prélèvement de pâte entraîne un apport d'oxygène dans la cuve de 0,195 mmoles qui sera à prendre en compte lors des mesures de consommation d'oxygène. Si le pétrissage entraîne des variations de pression au sein de la cuve, l'utilisation du système de prélèvement aura une influence sur la pression qui peut être quantifiée.

#### **4.1.1.2 Détermination du volume du système**

Inspirée de travaux préalablement réalisés au laboratoire (Celhay, 2000), l'exploitation des résultats concernant les gaz (pression totale et pression partielle) nécessite la connaissance du volume du système « pétrin – analyseur » par la détermination précise du volume gazeux du système à vide. Le principe est basé sur la mesure de la libération d'une quantité connue de  $CO_2$  dans la cuve rendue hermétique (figure 59).



La réaction chimique est la suivante :



Le volume d'HCl concentré ajouté est constant (10 mL) et toujours en excès quelle que soit la quantité de CaCO<sub>3</sub> introduite dans le cristalliseur au départ. De cette façon, le volume gazeux ne varie pas selon les conditions de l'expérience et la réaction est totale. Ainsi, pour une mole de CaCO<sub>3</sub> introduite, une mole de CO<sub>2</sub> dans l'enceinte est libérée. Dans la suite, l'ensemble des gaz contenus dans la cuve est assimilé à un gaz parfait, et la cuve étant thermorégulée à 20 °C, nous considérons que la température du gaz est également de 20 °C. A cette température, le volume molaire d'un gaz parfait est de 24,05 L.

Le volume gazeux dans l'enceinte est calculé par la relation (XV) suivante :

$$(XV) \quad V_{\text{sitoe xp}} = \frac{m_{\text{CaCO}_3}}{MM_{\text{CaCO}_3}} \times \frac{100 \times V_{m20^\circ\text{C}}}{\Delta\% \text{CO}_2}$$

avec,

$V_{\text{sitoe xp}}$  : Volume gazeux dans l'enceinte du système « sitoxygraphe-analyseur de gaz » (L) contenant le cristalliseur et la solution d'HCl

$m_{\text{CaCO}_3}$  : masse de CaCO<sub>3</sub> (g)

$MM_{\text{CaCO}_3}$  : masse molaire CaCO<sub>3</sub> ( $MM_{\text{CaCO}_3} = 100,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$V_{m20^\circ\text{C}}$  : Volume molaire d'un gaz parfait à 20 °C et à pression atmosphérique ( $V_{m20^\circ\text{C}} = 24,05 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$\Delta\% \text{CO}_2$  : Variation de la teneur en CO<sub>2</sub> (%) au sein de la cuve du sitoxygraphe entre le  $t_{\text{initial}}$  et le  $t_{\text{final}}$  de la réaction.  $\Delta\% \text{CO}_2 (\%) = \% \text{CO}_{2\text{fin}} - \% \text{CO}_{2\text{ini}}$

La masse de CaCO<sub>3</sub> introduite dans le cristalliseur au sein du pétrin varie entre 0,1 g et 0,4 g. En répétant l'expérience 8 fois consécutivement, le volume obtenu est :

$$V_{\text{sitoe xp}} = 9,807 \pm 0,108 \text{ L}$$

La valeur obtenue est répétable avec un coefficient de variation de 1,1 %. Compte tenu du volume de la solution d'acide (10 mL), et du volume du cristalliseur utilisé (environ 13

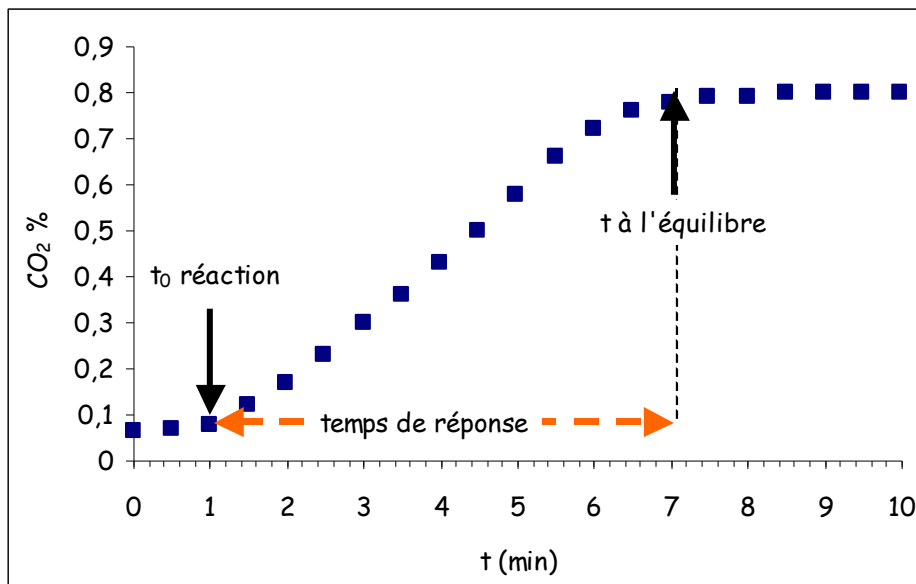


Figure 60. Evaluation du temps de réponse du système à vide par libération d'une quantité connue de CO<sub>2</sub> dans la cuve

mL) pour réaliser la réaction chimique, il en résulte que le volume total du montage à vide  $V_{sito}$  est donc :

$$V_{sito} = 9,830 \pm 0,108 \text{ L}$$

Dans le chapitre consacré à la mise au point de la mesure de la consommation d'oxygène par la pâte, l'impact de l'erreur dans l'évaluation du volume de la phase gazeuse sur le calcul de la quantité d'oxygène consommé au cours du pétrissage sera discuté.

Au sitoxygraphe, il est possible de diminuer le volume de la phase gazeuse au-dessus de la pâte en insérant une pièce plastique au niveau du hublot supérieur. Le volume de cette pièce plastique a été déterminé par la même manipulation que précédemment. Le volume obtenu en présence de la pièce plastique est retranché aux 9,807 L précédemment déterminés. L'expérience a été réalisée 5 fois.

Le volume de la pièce plastique est :

$$V_{PP} = 0,957 \pm 0,054 \text{ L}$$

Calculé à partir de la densité du polyméthylmétacrylate (PMMA) ( $\rho = 1,18$  à  $1,2 \text{ g.cm}^{-3}$ ) constituant principalement cette pièce plastique, le volume calculé est de 0,96 L.

### 4.1.2 Inertie de la réponse sur les mesures de gaz

L'analyseur de gaz Cristal 300 a été adapté sur le sitoxygraphe. L'air de l'enceinte de la cuve circule à travers le point froid et le filtre à un débit de  $110 \text{ L.h}^{-1}$ .

#### 4.1.2.1 Du système à vide

L'expérience précédente de détermination du volume du système « pétrin-analyseur de gaz » à partir de la libération d'une quantité connue de  $\text{CO}_2$  dans l'enceinte renseigne aussi sur l'inertie de la réponse de notre système de mesure. En effet, nous considérons que tout le  $\text{CO}_2$  libéré est bien homogénéisé dans tout le système (par l'action de la pompe de l'analyseur principalement) quand la mesure de  $\text{CO}_2$  est stabilisée (figure 60). Le graphe de la figure 60 montre qu'après 7 min le signal du  $\text{CO}_2$  est très stable dans le temps (0,3 % de variation jusqu'à 60 min, résultat non montré). Entre le début de la réaction (mise en présence des



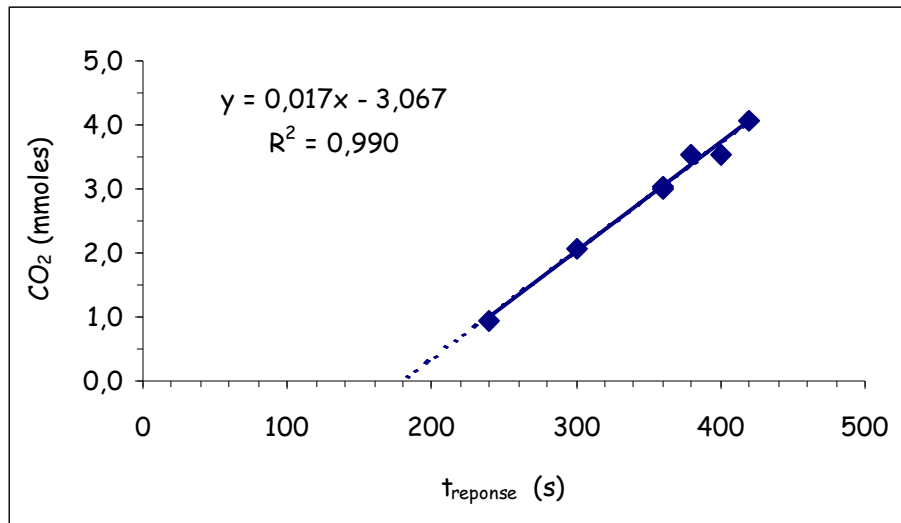


Figure 61. Vitesse d'apparition du CO<sub>2</sub> en fonction du temps mesuré dans l'enceinte du sitoxygraphe par l'analyseur de gaz.

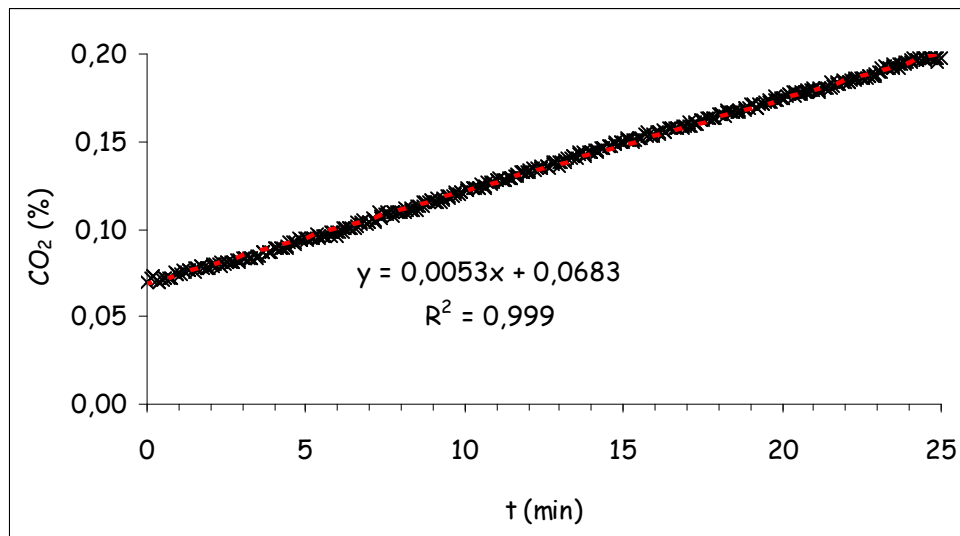


Figure 62. Evolution de la teneur en CO<sub>2</sub> d'une pâte non levurée pendant 25 minutes de pétrissage au sitoxygraphe. Points expérimentaux (x), courbe modélisée (pointillés rouge)

réactifs) et l'obtention d'un signal stable, il s'est écoulé environ 6 min. Cette durée (temps de réponse) est liée à la vitesse de la réaction de production de CO<sub>2</sub>, à la vitesse d'homogénéisation de l'atmosphère gazeuse et à l'inertie du capteur. L'inertie du capteur est inférieure à quelques secondes. Ce facteur peut être négligé. Pour chaque expérimentation, le temps de réponse est exprimé en fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> (en mmoles) libérée (figure 61). Ces quantités correspondent stœchiométriquement aux quantités de CaCO<sub>3</sub> mises en oeuvre. Il apparaît que le temps de réponse augmente linéairement avec la quantité de CO<sub>2</sub> libérée. L'extrapolation de la droite pour une quantité de CO<sub>2</sub> libérée nulle donne un temps de réponse de 180 s. Ce temps correspond à la durée d'homogénéisation du contenu de la phase gazeuse après introduction d'une perturbation dans l'atmosphère du pétrin à vide (bras immobile) sous le seul effet de la pompe de circulation des gaz associée au capteur. Cette durée est réduite par la diminution du volume de phase gazeuse en introduisant la pièce plastique (résultats non montrés). De même, cette durée d'homogénéisation sera d'autant plus courte que la quantité de pâte mise en oeuvre est importante par le double effet de la réduction de volume gazeux et du mouvement du bras mobile.

### **4.1.2.2 Du système en charge**

Les deux conditions nécessaires pour mesurer la consommation d'oxygène des systèmes redox de la pâte sont la présence de l'oxygène au contact des systèmes enzymatiques engagés et l'incorporation de l'oxygène atmosphérique aux bulles de gaz présentes dans la pâte. Ainsi, dans une pâte au repos, les systèmes consommateurs d'oxygène vont appauvrir en oxygène les bulles de gaz emprisonnées dans la pâte. Dans une première approximation, nous considérerons que seule l'action de pétrissage permet la mise en contact des acteurs de l'oxydation. Dans ce cas, pour une pâte au repos, aucune variation de la teneur en oxygène de l'atmosphère entourant celle-ci ne devrait être observée. En effet, en arrêtant le bras du pétrin, les systèmes enzymatiques sont privés d'un de leurs substrats redox, l'oxygène et par là même, sa consommation est bloquée.

#### **4.1.2.2.1 Sur la mesure de CO<sub>2</sub>**

Lors du pétrissage d'une pâte composée uniquement d'eau, de farine et de sel, nous observons une augmentation du pourcentage de CO<sub>2</sub> (figure 62) proportionnelle au temps ( $R^2 = 0,999$ ). Cette augmentation est faible puisque après 25 min de pétrissage, la teneur en CO<sub>2</sub> est passée de 0,07 % à 0,18 % environ soit une vitesse de  $5,3 \cdot 10^{-3} \% \text{ de CO}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ . Cette

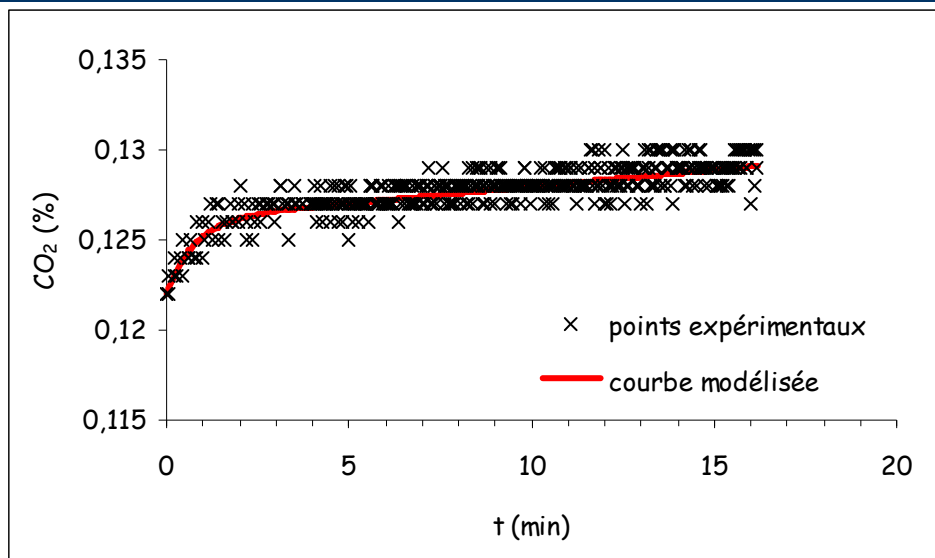


Figure 63. Evolution du signal mesuré sur la voie CO<sub>2</sub> bt à partir de l'arrêt du moteur (ici après 10 minutes de pétrissage). t = 0 min correspond au temps de l'arrêt du bras.

Tableau 20. Détermination des coefficients du modèle de réponse du signal CO<sub>2</sub> bt, après arrêt du moteur.

| arrêt (min)               | 5        | 7,5      | 10       | 15       | 20       | moyenne  | ET       |
|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| k1 (%)                    | 0,090    | 0,104    | 0,118    | 0,142    | 0,172    | -        | -        |
| k2 (%)                    | 4,94E-03 | 3,51E-03 | 4,11E-03 | 7,55E-03 | 1,64E-03 | 4,35E-03 | 2,16E-03 |
| k3 (min <sup>-1</sup> )   | 0,958    | 1,430    | 1,312    | 1,560    | 1,312    | 1,315    | 0,224    |
| k4 (%.min <sup>-1</sup> ) | 1,94E-04 | 1,72E-04 | 1,85E-04 | 1,71E-04 | 1,64E-04 | 1,77E-04 | 1,20E-05 |

expérience a été répétée en arrêtant le moteur du pétrin aux temps  $t = 5 - 7,5 - 10 - 15$  et 20 min. La figure 63 illustre l'évolution de la teneur en  $\text{CO}_2$  après l'arrêt du bras (arrêt effectué à 10 min de pétrissage). L'allure de la courbe montre que deux cinétiques se superposent :

- Une phase exponentielle d'équilibrage entre l'atmosphère dans la cuve et celle du capteur (180 s) ;
- une augmentation du signal lente et proportionnelle au temps.

Pour chaque expérience et au vu de l'allure de la réponse, le signal a été modélisé par la fonction suivante :

$$(XVI) \quad \text{CO}_2 = k_1 + k_2 \times (1 - \exp(-k_3.t)) + k_4.t$$

avec,

$k_1$  : valeur du signal  $\text{CO}_2$  bt (%  $\text{CO}_2$ ) à l'instant  $t = 0$  (arrêt du bras mobile du pétrin)

$k_2$  : amplitude de la réponse (%  $\text{CO}_2$ )

$k_3$  : constante de temps ( $\text{min}^{-1}$ )

$k_4$  : coefficient directeur de la droite (%  $\text{CO}_2.\text{min}^{-1}$ )

La détermination des constantes a été réalisée à l'aide du solveur d'Excel (tableau 20). D'un point de vue général, la constante de temps ( $k_3$ ) varie peu (moyenne =  $1,315 \pm 0,224 \text{ min}^{-1}$ ), tout comme l'amplitude de la réponse ( $k_2$ ), dont la valeur moyenne est de  $5,03.10^{-3} \pm 1,5.10^{-3} \text{ \%CO}_2$ . Pour ce dernier la précision du résultat est relative puisque le CV est proche de 31 %. Par ailleurs, le coefficient de la droite ( $k_4$ ) diminue en fonction du moment d'arrêt du bras.

Pendant le pétrissage, l'enceinte gazeuse est homogénéisée par le mouvement du bras entraînant la pâte à vitesse constante et par la circulation des gaz à un débit constant par la pompe de l'analyseur. De ce fait, le temps d'homogénéisation des gaz dans l'enceinte du système devrait être constant. En suivant cette hypothèse, l'observation au niveau du capteur d'une production linéaire de  $\text{CO}_2$  au cours du temps (pente =  $0,0053 \text{ \% CO}_2.\text{min}^{-1}$ , figure 63) indique que la production de  $\text{CO}_2$  au niveau de la pâte est aussi proportionnelle au temps. Quand le bras du pétrin est stoppé, la libération de  $\text{CO}_2$  par l'action du pétrissage est arrêtée brusquement. Seule l'action de la pompe de circulation des gaz permet l'homogénéisation de l'enceinte gazeuse. Près de 80 s (1,3 min) sont nécessaires pour atteindre l'équilibre de la réponse du capteur de  $\text{CO}_2$ . L'écart entre le pourcentage affiché à l'arrêt du bras et l'équilibre est de  $5,03.10^{-3} \text{ \% de CO}_2$ . Si le bras est en mouvement, une hausse de  $5,03.10^{-3} \text{ \% de CO}_2$

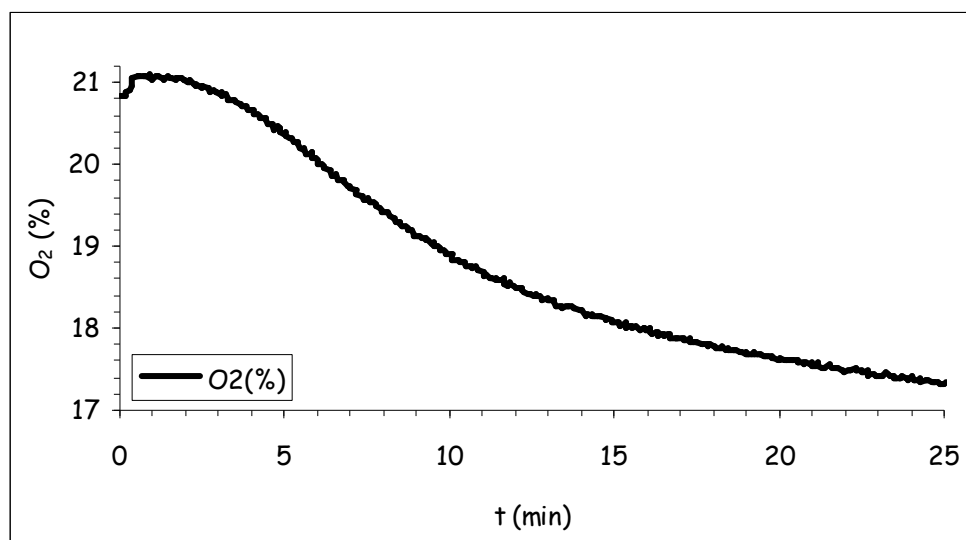


Figure 64. Evolution de la teneur en O<sub>2</sub> au cours du pétrissage d'une pâte contenant 2,5 kg de farine, 1,5 L d'eau et 45 g de NaCl

dans l'enceinte est observée au bout de 57 s. Les résultats obtenus sont donc cohérents avec l'hypothèse que le brassage mécanique améliore le temps d'homogénéisation de l'enceinte gazeuse. Le gain de temps (23 s pour une augmentation de 5,03 % de CO<sub>2</sub>) calculé représente 30 % de celui nécessaire à la pompe pour la mise en équilibre des gaz.

Par ailleurs, une pâte non levurée produit du CO<sub>2</sub> (figure 62). La présence d'une flore microbienne endogène responsable de cette production paraît être la seule explication possible pour qu'une pâte non levurée produise du CO<sub>2</sub> pendant le pétrissage. De plus, cette flore est active dès les premiers instants de pétrissage. Dans le cadre de nos essais, après l'arrêt du bras, le CO<sub>2</sub> produit est emprisonné dans la pâte (plus de libération de celui-ci par le pétrissage). Après la mise en équilibre de la phase gazeuse (homogénéisation par la pompe de l'analyseur de gaz), une production lente de CO<sub>2</sub> par la pâte au repos se poursuit. L'augmentation du pourcentage de CO<sub>2</sub> dans l'enceinte est relatif à la diffusion de celui-ci à travers la pâte au repos. Le rapport entre  $k_{4moyen}$  et la pente de la droite (figure 62) vaut 0,028, la vitesse de diffusion du CO<sub>2</sub> à travers la pâte représente donc 3 % de la vitesse de libération du CO<sub>2</sub> par homogénéisation mécanique ce qui illustre la lenteur des phénomènes diffusionnels. Par ailleurs, la vitesse de production ( $k_4$ ) diminue proportionnellement à l'instant d'arrêt du bras. Si l'on admet que l'activité microbienne est constante pendant les 25 min de pétrissage, au fur et à mesure du pétrissage, la capacité de rétention de CO<sub>2</sub> semble être améliorée puisque les vitesses de diffusion de celui-ci à travers la pâte diminuent. Ces résultats confirment qu'une des fonctions du pétrissage est de structurer la pâte et lui conférer la capacité de rétention du CO<sub>2</sub>. Dans les applications technologiques, la mesure de la capacité de rétention gazeuse d'une pâte est un critère important à mesurer et maîtriser. La mesure des teneurs en gaz dans l'enceinte du sitoxygraphe est par conséquent très prometteuse. Les observations sur pâte non levurées ne permettent pas de poursuivre la discussion autour du terme de porosité, qui nécessite la réalisation d'expériences spécifiques, en présence de levure. Cette partie constituerait un nouveau développement de l'utilisation du pétrin. Peut-on envisager un mouvement très lent de la pâte qui relargue le CO<sub>2</sub> par un phénomène différent de la diffusion ?

### 4.1.2.2.2 Sur la mesure d'O<sub>2</sub>

Le même raisonnement que précédemment a été appliqué à la mesure d'O<sub>2</sub>. L'allure de la courbe de mesure de l'oxygène dans la phase gazeuse est de type sigmoïde (figure 64). En tout début de pétrissage, la réponse du capteur à O<sub>2</sub> augmente brusquement et passe de 20,90

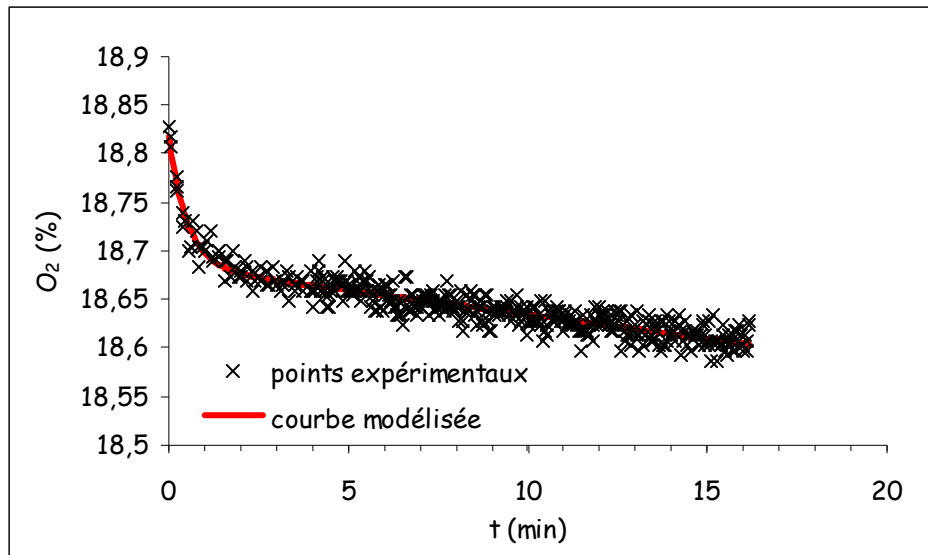


Figure 65. Evolution du signal mesuré sur la voie O<sub>2</sub> à partir de l'arrêt du moteur (ici après 10 min pétrissage). t = 0 min correspond au temps de l'arrêt du bras.

Tableau 21. Détermination des paramètres du modèle prévoyant la réponse du capteur à O<sub>2</sub> après arrêt du bras du pétrin. *nd* : non déterminé. (R<sup>2</sup> toujours supérieur à 0,99)

| arrêt (min)               | 5         | 7,5       | 10        | 15        | 20        | moy       | ET        |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| k5 (%)                    | 20,5      | 19,5      | 18,9      | 18,0      | 17,6      | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| k6 (%)                    | 1,19E-01  | 1,29E-01  | 1,33E-01  | 4,24E-02  | 3,87E-02  | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| k7 (min <sup>-1</sup> )   | 1,32      | 1,03      | 1,413     | 1,560     | 1,312     | 1,40      | 0,12      |
| k8 (%.min <sup>-1</sup> ) | -6,38E-03 | -5,65E-03 | -4,96E-03 | -1,39E-02 | -1,47E-02 | <i>nd</i> | <i>nd</i> |

## Résultats et Discussions

à  $t = 0$  à 21,15 % au bout d'une min. Puis, une phase de latence apparaît pendant laquelle le signal diminue très lentement jusqu'à 2 min. Ensuite, la diminution du signal d' $O_2$  est rapide jusqu'à 5-6 min, où la pente de la courbe semble atteindre un maximum. Après ce temps, la diminution du signal d'oxygène est de plus en plus lente, et vers 25 min, la pente de la courbe semble tendre vers une valeur limite non nulle. Entre  $t = 0$  et  $t = 25$  min, la teneur en  $O_2$  varie de 20,9 % à 17,3 % environ d'après notre courbe témoin. Les données « oxygène » obtenues lors de l'expérience précédente (arrêt du moteur aux temps  $t = 5 - 7,5 - 10 - 15$  et 20 min) ont été analysées. La figure 65 illustre l'évolution de la teneur en  $O_2$  après l'arrêt du bras. Comme dans le cas du  $CO_2$ , l'allure de la courbe montre l'addition de deux phénomènes :

- une phase exponentielle d'équilibrage (180 s) ;
- une diminution du signal lente et proportionnelle au temps.

Pour chaque expérience et au vu de l'allure de la réponse, le signal a été modélisé par la fonction suivante :

|  |   |
|--|---|
| (XVII)   | $O_2 = k_5 + k_6 \times \exp(-k_7.t) + k_8.t$ |
| avec,  |   |
| $k_5$ : valeur du signal $O_2$ (% $O_2$ ) à l'instant $t = 0$ (arrêt du bras mobile du pétrin) |   |
| $k_6$ : amplitude de la réponse (% $O_2$ )   |   |
| $k_7$ : constante de temps ( $\text{min}^{-1}$ )   |   |
| $k_8$ : coefficient de la droite (% $O_2.\text{min}^{-1}$ )                                    |   |

La détermination des constantes a été réalisée à l'aide du solveur d'Excel (tableau 21) avec les critères de précision de  $1.10^{-6}$ , de tolérance de 5 % et de convergence de  $1.10^{-4}$ . Les critères d'optimisation sont : précision D'un point de vue général, l'amplitude de la réponse ( $k_6$ ) varie peu jusqu'à 10 min avec des valeurs fortes (0,12 – 0,13 %), puis diminue pour les points à 15 et 20 min (valeurs autour de 0,04 %). De même, le coefficient de la droite ( $k_8$ ) varie peu, jusqu'à 10 min, entre  $-5.10^{-3}$  et  $-6,4.10^{-3}$  %  $O_2.\text{min}^{-1}$ , puis augmente en valeur absolue à 15 et 20 min à  $-15.10^{-3}$  %  $O_2.\text{min}^{-1}$ . La valeur constante de temps d'équilibrage ( $k_7$ ) est indépendante du temps d'arrêt du bras (moyenne =  $1,4 \pm 0,12$ ). L'amplitude et la pente de la droite semblent dépendre de l'allure de la courbe d'oxygène. L'analyse de la figure 65 montre que la diminution de la teneur en oxygène est forte entre 5 et 10 min, ensuite, elle ralentit de façon progressive. Il semblerait que les évolutions de l'amplitude et de la pente de la droite soient liées à la vitesse de consommation d'oxygène. Entre 10 et 15 min de pétrissage, la vitesse de diminution de teneur en  $O_2$  ralentit fortement. Pour chaque temps, les vitesses de diminution du pourcentage d' $O_2$



Tableau 22. Pente de diminution du pourcentage d'O<sub>2</sub>.

| t (min) | pente<br>(%O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> ) |
|---------|--|
| 5       | -0,314   |
| 7,5     | -0,271   |
| 10      | -0,253   |
| 15      | -0,13  |
| 20      | -0,0672  |

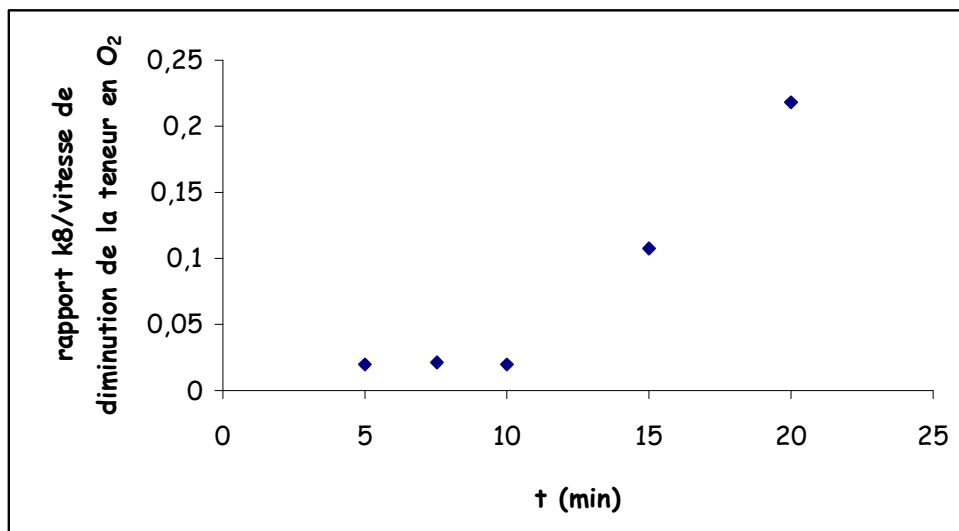


Figure 66. Evolution du rapport entre la pente d'évolution du pourcentage de O<sub>2</sub> de la pâte au repos (k8) et la vitesse de diminution du pourcentage d'O<sub>2</sub> de la pâte pétrie au cours du pétrissage

ont été calculées (tableau 22). La diminution de vitesse entre 5 et 10 min est lente et linéaire (de  $-0,314 \text{ \% d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$  à  $-0,25 \text{ \% d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ , pente  $0,012 \text{ \% d'O}_2 \cdot \text{min}^{-2}$ ). Entre 10 et 15 min, elle chute de façon deux plus fois importante ( $0,025 \text{ \% d'O}_2 \cdot \text{min}^{-2}$ ), et entre 15 et 20 min, la perte de vitesse redevient identique à celle entre 5 et 10 min. Les rapports entre la vitesse de diminution du pourcentage d'O<sub>2</sub> dans la cuve quand la pâte est au repos et la vitesse de diminution de la teneur en O<sub>2</sub> de la pâte pétrie ont été tracés au cours du temps (figure 66). De façon intéressante, entre 5 et 10 min, ce rapport est stable et vaut environ 0,02. A partir de 10 min, il augmente fortement (0,11 à 15 min et 0,22 à 20 min).

En consommant l'oxygène dans la pâte, les systèmes redox responsables de la diminution de l'oxygène dans la phase gazeuse créent un gradient entre le gaz au contact des systèmes enzymatiques et le reste de l'atmosphère environnant la pâte et le capteur. Pendant les 10 premières min, la vitesse de diffusion de l'O<sub>2</sub> au sein de la pâte est imposée par la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> des systèmes redox, alors très actifs. Après 10 min, ceux-ci sembleraient se dénaturer et ne sont vraisemblablement plus prépondérants dans leur rôle créateur de gradient entre O<sub>2</sub> entre l'intérieur et l'extérieur de la pâte. La diminution de vitesse est proportionnelle au temps et faible, alors que le paramètre  $k_8$  est quasi-stable. En fin de pétrissage, la vitesse de diffusion de l'O<sub>2</sub> à travers la pâte pourrait être en lien avec le paramètre  $k_8$ .

En résumé, la mesure de la consommation d'oxygène d'une pâte de 4 kg au sitoxygraphe, dont le volume de gaz pendant le pétrissage est proche de 7 L, entraîne une inertie de réponse, d'une part sur le CO<sub>2</sub> et d'autre part sur l'O<sub>2</sub>. La première est difficile à prendre en compte. Cependant, elle peut être négligée étant donné la faible variation de la voie CO<sub>2</sub> (dans le cas des pâtes non levurées). En ce qui concerne la valeur d'oxygène au sein de la cuve, celle-ci est surestimée à l'instant  $t$  du fait de l'inertie. Pour la pâte au repos, une durée d'environ 180 s est nécessaire à l'homogénéisation de la composition de la phase gazeuse par la pompe de circulation au niveau des capteurs O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Dans la pâte en mouvement, cette durée d'homogénéisation est plus faible.

### 4.1.3 Influence de la pression sur la réponse du capteur de mesure d'oxygène

La courbe de l'évolution du pourcentage d'oxygène présentée dans la figure 64 présente une particularité surprenante, puisque à défaut d'observer une consommation d'oxygène, lors de la première minute de pétrissage, une apparente production d'O<sub>2</sub> est observée. En effet, dès



la mise en route du bras, une augmentation du pourcentage d'oxygène apparaît au sein de la cuve de 20,83 % à 21,09 % au cours de la première minute de frasage. Cette variation de 0,26 % représente environ 7 % de la variation de teneur en oxygène affichée par le capteur électrochimique entre le temps  $t = 0$  et le temps  $t = 25$  min dans le cas du pétrissage de la figure 64.

### 4.1.3.1 Description du phénomène

Ce phénomène est observé systématiquement lors de chaque pétrissage, il est répétable pour des pétrissages dans des conditions identiques. Un phénomène identique a déjà été observé lors de précédents travaux menés au laboratoire au moyen du pétrin bioréacteur (Potus, 1997 et Ameille *et al.*, 2000b). Potus (1997) part de l'idée qu'il s'agit d'une libération d'oxygène provenant de l'un des constituants de la pâte : la farine ou l'eau. En suivant l'évolution de la concentration en oxygène dans un flux d'azote en présence d'eau ou de farine dans l'enceinte du bioréacteur, ces auteurs ont estimé que la quantité d'oxygène libérée par kg de farine lors de cette expérience s'élève à  $10 \text{ mmol.kg}^{-1}_{\text{farine humide}}$  ce qui correspond à la quantité d'oxygène de l'air contenu dans l'espace intergranulaire de la farine calculée à partir des données de densité apparente (0,6) et réelle (1,35) fournies par la littérature (Melcion, 1991). La part qui pourrait provenir d'un dégazage de l'eau est négligeable (70 fois plus faible que celle apportée par la farine humide).

Potus (1997) et Ameille *et al.* (2000) préconisent d'ajouter l'eau en premier dans la cuve du bioréacteur pour permettre le dégazage avant la fermeture étanche du pétrin. En adoptant ce protocole, on observe tout de même une légère hausse de la mesure d' $\text{O}_2$  au bioréacteur qui ne dépasse pas 0,05 % et est donc négligée. L'étanchéité du bioréacteur est réalisée au niveau du frasseur par un joint liquide (figure 54). Il est fort probable que ce joint serve de tampon en permettant d'évacuer les gaz libérés dans l'enceinte de la cuve du pétrin bioréacteur lors de surpressions éventuelles.

Au sitoxygraphe, le dégazage de la farine ne semble concerner que l'oxygène (figure 64). et probablement l'azote. En effet, la variation de la teneur en  $\text{CO}_2$  au sein de la cuve est identique lors de la formation de la pâte et lors du pétrissage de la pâte en elle-même. Ce résultat démontre qu'un dégazage spécifique d'oxygène apparaît peu probable et remet partiellement en cause les explications précédemment citées. On peut en effet difficilement concevoir que l'air interstitiel de la farine soit plus concentré en oxygène que l'air environnant la pâte dans la cuve du pétrin.

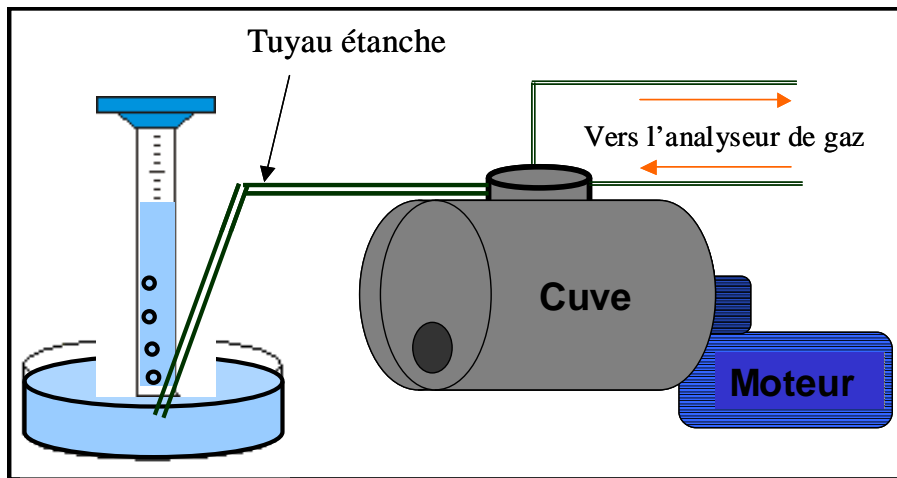


Figure 67. Principe de la détermination de la surpression dans la cuve du sitoxygraphe lors de la formation de la pâte au début du pétrissage

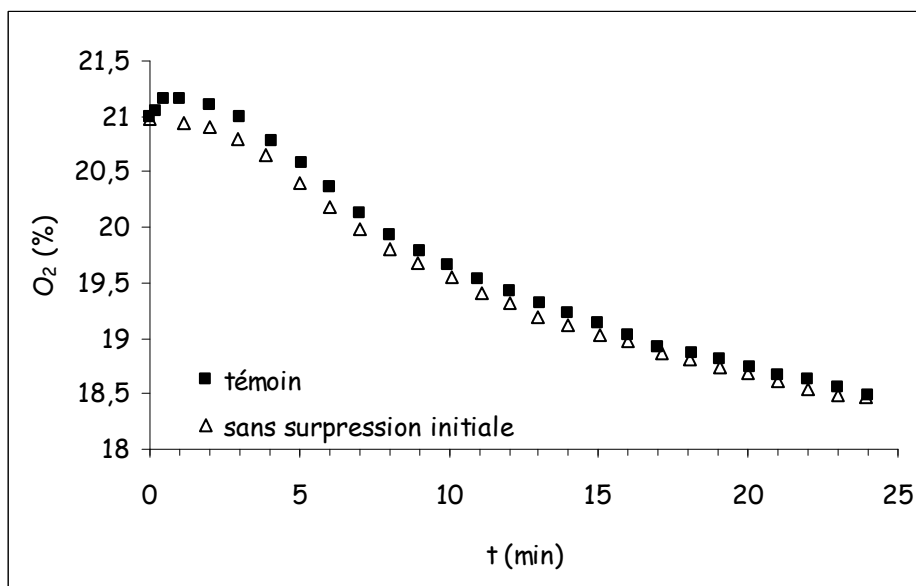


Figure 68. Evolution de la mesure du pourcentage d'O<sub>2</sub> dans la cuve. Influence de la variation de pression sur la mesure

#### **4.1.3.2 Mise en évidence d'une surpression dans l'enceinte étanche lors de la 1<sup>ère</sup> min de pétrissage**

L'expérience décrite dans la figure 67 a été mise en place pour déterminer une éventuelle variation de volume de pâte lors de sa formation. L'enceinte étanche de la cuve est relié par un tuyau plastique étanche à une éprouvette remplie d'eau et retournée dans un cristallisateur, permettant ainsi de maintenir égale la pression extérieure et intérieure du pétrin. Cette expérience a été réalisée pour diverses conditions de pétrissage en faisant varier la masse de pâte de 4 à 5 kg et l'hydratation de celle-ci de 55 à 65 %. Pour toutes ces conditions, le volume mesuré dans l'éprouvette graduée est compris entre 90 et 130 mL. Ce résultat indique que lorsque la farine s'hydrate, le volume de la pâte formée est plus important que celui de ses constituants pris séparément, c'est-à-dire la farine, l'eau et le chlorure de sodium. Le manque de précision de la manipulation est probablement à l'origine d'une forte variation des résultats mais nous avons aussi observé que le volume d'air dans l'éprouvette n'est pas uniforme selon les pétrissages. En effet, il apparaît pendant une durée plus ou moins longue comprise entre 0 et 2 min. On peut raisonnablement penser que la formation de la pâte, passage de l'état « farine + eau » à l'état de milieu pâteux viscoélastique, varie d'une expérience à l'autre, indépendamment des conditions de l'expérience. D'après les résultats obtenus, les variations de volume de la phase gazeuse dans l'éprouvette graduée provoqueraient des variations de pression au sein de la cuve hermétique de l'ordre 14 à 23 mbar. Au-delà, le liquide remonte progressivement dans le tuyau.

Par ailleurs, pour chaque expérience où l'on évacue la surpression, nous avons vérifié que le signal délivré par la voie O<sub>2</sub> de l'analyseur de gaz n'augmentait plus brusquement pendant la première min de l'expérience. La valeur mesurée était constante, voire diminuait très légèrement, signe d'un début de consommation d'oxygène après une min de pétrissage (figure 68). Il apparaît ainsi que la réponse du capteur oxygène est sensible à la pression totale (pour une même teneur en O<sub>2</sub>, la réponse augmente avec la pression totale). Le graphique compare l'évolution de la mesure d'oxygène d'une courbe obtenue dans les conditions classiques (4 kg de pâte hydratée à 60 %) de pétrissage avec le sitoxygraphe rendu hermétique avec une courbe obtenue dans les mêmes conditions de pétrissage (vitesse des bras, hydratation, masse de pâte) mais en évitant la surpression initiale grâce au système mis en place précédemment (figure 67). L'utilisation de ce dispositif permet d'évacuer le volume de gaz libéré par la formation de la pâte dans la phase initiale. Au-delà (après 2 min), l'eau



remonte dans le tuyau traduisant une diminution progressive de la pression dans la cuve du pétrin (consommation d'O<sub>2</sub>).

La figure 68 montre que l'écart entre la courbe témoin et la courbe obtenue en évitant la surpression initiale est important au début du pétrissage (jusqu'à 0,2 % au bout de 1 min de pétrissage). Cet écart diminue progressivement pour se trouver dans le domaine de l'erreur expérimentale après 10 min de pétrissage, la courbe témoin étant toujours située au-dessus de la courbe obtenue avec le dispositif d'évacuation. Ceci peut s'expliquer par le fait que, pour une même consommation d'oxygène, la pression totale dans l'expérience témoin est toujours supérieure à celle dans l'expérience avec le dispositif d'évacuation.

En résumé, la formation de la pâte provoque une augmentation du volume de celle-ci qui entraîne l'apparition d'une surpression dans la cuve du pétrin. Cette faible surpression estimée à environ 25 mbar modifie la réponse du capteur à O<sub>2</sub> de façon importante (0,2 %) et modifie la cinétique de consommation d'oxygène apparente en début de pétrissage. En absence de surpression initiale, l'allure de la courbe de consommation d'oxygène est de type sigmoïde avec une faible consommation pendant la formation de la pâte.

### ***4.1.3.3 Evolution de la pression pendant le pétrissage***

Lors de l'expérience présentée sur la figure 67, l'eau du cristallisateur est aspirée dans le tuyau étanche au cours du pétrissage que l'on a assimilé à l'apparition d'une dépression au sein de la cuve.

Pendant le pétrissage d'une pâte sans levure, la pression totale varie, d'une part parce que le nombre de moles de gaz de l'atmosphère environnant la pâte diminue en raison de l'incorporation de l'oxygène par les réactions d'oxydoréduction, et d'autre part parce que le volume occupé par la pâte dans la cuve varie pendant le pétrissage. Dans la phase de formation de la pâte, l'hydratation des particules de farine fait augmenter le volume de celle-ci. Lors du pétrissage, l'action mécanique provoque ensuite un réarrangement des molécules constitutives de la pâte et modifie les interactions de ces molécules (protéines, pentosanes, glucides, etc.) entre elles, et entre elles et l'eau. En même temps, les réactions d'oxydation font diminuer le nombre de moles d'oxygène dans l'atmosphère gazeuse. La flore microbienne endogène et la levure font diminuer la teneur en O<sub>2</sub> et augmenter la teneur en CO<sub>2</sub>. Donc lors du pétrissage, la variation de pression traduit une variation du nombre de moles totales de gaz (consommation d'O<sub>2</sub> et production de CO<sub>2</sub>) dans la cuve ainsi qu'une variation du volume de pâte.



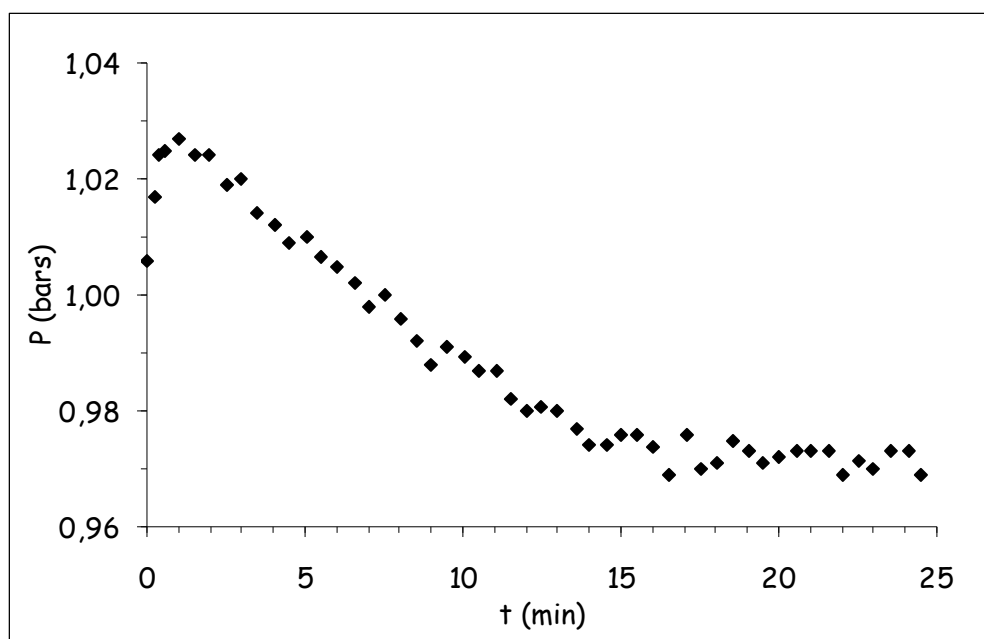


Figure 69. Evolution de la mesure de pression au sein de l'atmosphère étanche du sitoxygraphe (3,2 kg de farine hydratée à 60 % d'eau avec 1,8 % de NaCl)

Pour vérifier les variations de pression pendant un pétrissage témoin, un capteur a été mis en place pour mesurer la pression au sein de la cuve. Un exemple de la mesure de la pression totale dans le système « sitoxygraphe » au cours du pétrissage d'une pâte sans levure est donné dans la figure 69. Les conditions de pétrissages sont les suivantes : 3,2 kg de farine à laquelle on ajoute 60 % d'eau et 1,8 % de NaCl. L'allure de la courbe confirme que lors de la formation de la pâte, le volume de celle-ci augmente puisqu'une brusque augmentation de 20 mbar de la pression totale est observée dans la cuve. A partir du début du pétrissage (à  $t = 2$  min), la pression totale diminue proportionnellement au temps jusqu'à environ 15 min, et à partir de 15 min, elle diminue faiblement entre 965 et 975 mbar. Entre la pression maximale et la pression en fin de pétrissage, il y a donc un écart de 65 mbar.

Le point de départ de la mise en place d'un capteur de pression sur la cuve du sitoxygraphe est de corriger la mesure de la teneur en oxygène dans la phase gazeuse, puisque lors de la formation de la pâte, les pourcentages d'O<sub>2</sub> affichés étaient surestimés et non représentatifs des réactions se produisant au sein de la pâte. Par la suite, quand la pression devient inférieure à la pression atmosphérique au cours du pétrissage, les pourcentages mesurés sont sous-estimés et par conséquent, la consommation d'oxygène est surestimée. Il était donc primordial de connaître l'influence de la pression au sein de la cuve sur la mesure du pourcentage d'oxygène dans le sitoxygraphe pour quantifier de façon la plus précise possible la consommation d'oxygène attribuables aux systèmes redox au cours du pétrissage. De plus, la mesure de pression en tant que telle présente également de nombreux intérêts et applications potentielles, car dans la configuration de notre pétrin étanche à l'air et à la pression, il est possible d'étudier l'évolution du volume de la pâte (important) et de sa densité à chaque instant du pétrissage.

### ***4.1.3.4 Etalonnage de la réponse du capteur à O<sub>2</sub> en fonction de la pression dans la cuve du sitoxygraphe***

Pour étudier l'influence de la pression sur la réponse du capteur à oxygène, un modèle simulant une hausse de pression par une diminution du volume de phase gazeuse dans la cuve du pétrin a été mis en place. Pour cela, le pétrin à vide est rendu hermétique et différents volumes d'air (0 – 30 – 60 – 120 mL) sont injectés dans la cuve du pétrin à l'aide d'une seringue à piston. Durant cette expérience, seule la pression varie, la composition de la phase gazeuse reste constante. Les résultats sont représentés sur le graphe de la figure 70. La droite

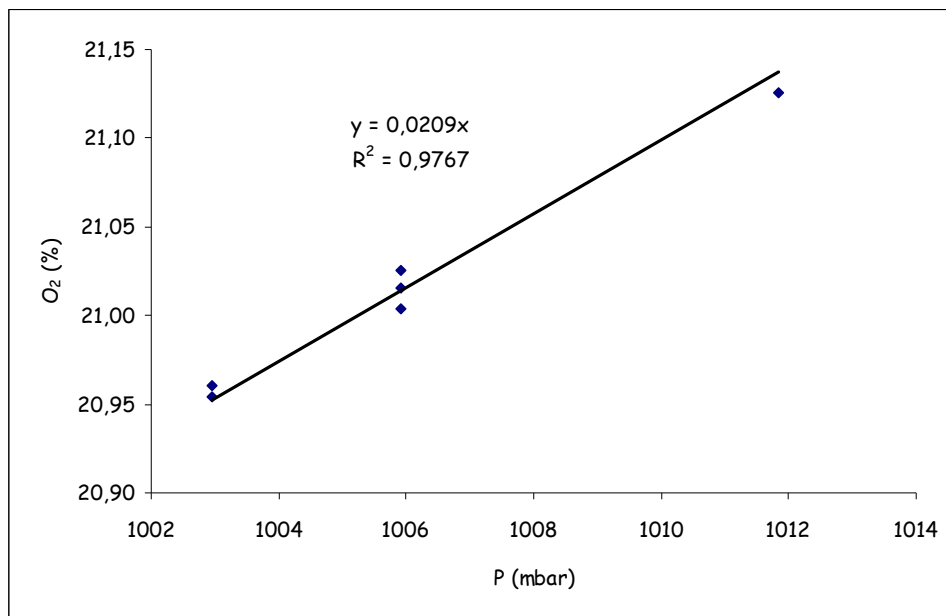


Figure 70. Représentation de la variation du pourcentage d'O<sub>2</sub> en fonction de la variation de pression au sein de la cuve du sitoxygraphe à vide, moteur tournant à 30 rpm pour une teneur initiale de 20,9 % d'O<sub>2</sub> à la pression atmosphérique.

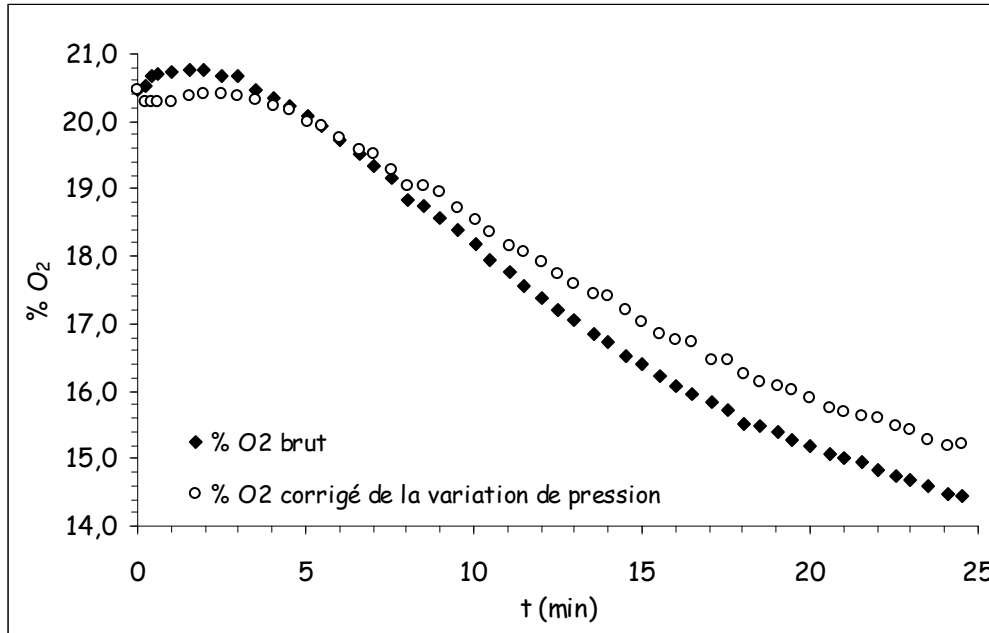


Figure 71. Evolution du pourcentage d'oxygène (corrigé ou non des variations de pression) dans l'enceinte du sitoxygraphe lors du pétrissage d'une farine BPMF (3,2 kg hydratée à 60 % d'eau et avec une teneur en NaCl de 1,8 % ajouté).

d'étalonnage obtenue nous donne un coefficient de  $0,0209 \text{ \% O}_2 \cdot \text{mbar}^{-1}$  (ou  $2,09 \cdot 10^{-4} \text{ \% O}_2 \cdot \text{Pa}^{-1}$ ) avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,98$ .

La figure 71 présente la courbe de consommation d'oxygène correspondant aux conditions d'expériences citées ci-dessus. La teneur en oxygène varie de 20,5 à 14,5 % entre le temps  $t = 0$  et le temps  $t = 25$  min, soit une variation de 6 % du nombre de moles d'oxygène. D'après la courbe corrigée de la variation de pression, la teneur en oxygène varie de 20,5 à 15,2 % entre le temps  $t = 0$  et le temps  $t = 25$  min, soit une variation de 5,3 % du nombre de moles d'oxygène. Si on considère que la quantité de  $\text{N}_2$  présente est constante et que l'on néglige la production (faible) de  $\text{CO}_2$  au cours du pétrissage, on a une variation de 5,3 % du nombre de moles totales, qui entraînerait une variation de pression de 5,3 % entre la pression maximale et la pression en fin de pétrissage si le volume de phase gazeuse est constant. Par le calcul on obtient une pression en fin de pétrissage de 975 mbar. Ce calcul montre que la diminution du pourcentage d' $\text{O}_2$  engendre une dépression dans la cuve correspondant à la dépression mesurée par le capteur. Lors de la formation de la pâte, une brusque augmentation du volume de phase condensée accroît la pression. Dans un second temps, la diminution du pourcentage d' $\text{O}_2$  correspond à une quantité consommée par les systèmes redox ainsi qu'une variation du volume de pâte lors de sa structuration. En effet, la variation du volume de pâte peut influencer la pression dans l'enceinte, celle-ci est prise en compte par la correction du pourcentage d' $\text{O}_2$  affiché, mais une variation de volume gazeux pourrait aussi provoquer une variation de la concentration en  $\text{O}_2$  dans la cuve.

#### **4.1.4 Représentation de la consommation d' $\text{O}_2$ et de la production de $\text{CO}_2$ d'une pâte de farine de blé tendre non levurée**

Au vu des résultats précédemment évoqués, il est nécessaire de prendre en compte l'influence de la pression interne de la cuve et l'inertie de la réponse des capteurs à  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  sur les valeurs mesurées. Par rapport aux événements se produisant dans la cuve du pétrin, la réponse du capteur à  $\text{O}_2$  est :

- instantanée lors des variations de pression ;
- décalée de 2-3 min lors de la consommation d' $\text{O}_2$ .



La réponse du capteur à CO<sub>2</sub> est :

- indépendante des variations de pression ;
- décalée de 2-3 min lors de la production de CO<sub>2</sub>.

Dans ce chapitre, la loi des gaz parfaits ( $PV_g = nRT$ ) est appliquée.  $n$  est le nombre de moles de gaz dans le volume  $V_g$ .  $R$  correspond à la constante molaire des gaz parfaits et vaut 8,314 J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>. La pression ( $P$  en Pa), le volume gazeux ( $V_g$  en m<sup>3</sup>) et la température ( $T$  en K) sont exprimés dans les unités internationales.

La correction des valeurs brutes en tenant compte des variations de pression (figure 70) donne :

$$(XVIII) \quad \% O_{2cp(t)} = \% O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)}$$

avec,

$\% O_{2cp(t)}$  : pourcentage d'O<sub>2</sub> corrigé en prenant en compte l'influence de la pression sur le capteur de gaz (exprimé en % O<sub>2</sub>).

$\% O_{2(t)}$  : pourcentage d'O<sub>2</sub> mesuré (exprimé en % O<sub>2</sub>).

$\Delta P_{(t-t_0)}$  : différence entre la valeur de la Pression mesurée à l'instant  $t$  et la pression mesurée à l'instant  $t = 0$  correspondant à l'instant de mise en route du bras (exprimée en Pa).

Dans la relation (XVIII), la variation de pression instantanée ( $\Delta P_{(t-t_0)}$ ) est exprimée en Pa (voir chapitre précédent). Lorsque la pression atmosphérique est de 101325 Pa, la réponse du capteur mesurant la teneur en O<sub>2</sub> de l'air ambiant est fixé à 20,9 % et dans l'idéal, l'étalonnage doit être réalisé dans ces conditions de pression. Les variations de pression climatiques n'étant pas maîtrisées, en fonction de la valeur de la pression affichée par le capteur de pression, le pourcentage de pleine échelle affiché par le capteur d'O<sub>2</sub> est modifié lors de la mise en route, d'après une table de correspondance entre la teneur en O<sub>2</sub> (% O<sub>2</sub>) dans l'air affiché par le capteur à O<sub>2</sub> en fonction de la pression atmosphérique affichée par le capteur de pression.

La prise en compte de l'effet d'inertie sur la réponse est considérée identique pour les deux capteurs. Pour l'ensemble des expérimentations conduites dans des conditions de pétrissage variables (formulation des pâtes, présence de la pièce plastique, température des ingrédients et vitesse du bras), l'effet de l'inertie est variable, difficile à prévoir, mais nettement inférieur à 3 min. L'examen de l'ensemble des courbes de consommation d'O<sub>2</sub> (non corrigées de la pression) montre que la diminution des teneurs en O<sub>2</sub>



## Résultats et Discussions

---

n'est observable qu'après une minute de frasage dans la presque totalité des cas. En conséquence, une correction uniforme de 60 s sera appliquée sur l'échelle de temps de pétrissage. Ainsi, les données lues sur les capteurs à t min après la mise en route du pétrin correspondent à un temps (t-1) min de pétrissage pour les valeurs de concentrations des gaz dans la cuve qui en découlent par le calcul.

A partir des données des conditions expérimentales (masse des ingrédients ajoutés pris séparément), des densités des différents ingrédients et du volume à vide, il est possible de calculer le volume de la phase gazeuse à l'instant t = 0 du pétrissage (lorsque la cuve contient tous les ingrédients de la pâte non mélangés) à partir de l'équation XIX :

$$(XIX) \quad V_g = 10^{-3} \times \left( V_{sito} - \sum \left( \frac{m_i}{\rho_i} \right) \right)$$

avec,

$V_g$  : Volume gazeux dans l'enceinte fermée en présence de pâte (m<sup>3</sup>).

$V_{sito}$  : Volume gazeux dans l'enceinte fermée à vide (L).

$m_i$  : masse des ingrédients en kg

$\rho_i$  : masse volumique des ingrédients en kg.L<sup>-1</sup>

Les données de masse volumique des différents composants utilisés dans la recette de nos pâtes boulangères sont respectivement de 1,35 g.cm<sup>-3</sup> pour la farine et 2,16 g.cm<sup>-3</sup> pour le NaCl. Ainsi, pour notre farine témoin (2,5 kg de pâte hydratée à 60 % d'eau et contenant 1,8 % de NaCl), le volume de gaz déterminé est de 6,48.10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>.





## Résultats et Discussions

---

En appliquant la loi des gaz parfaits, on peut calculer le nombre total de moles présentes dans l'enceinte de la cuve à l'instant initial  $t = 0$ . A la pression atmosphérique, en considérant que la température à l'intérieur du pétrin est de  $20^{\circ}\text{C}$  (température de la régulation), le nombre de moles totales ( $n_{T0}$ ) initial est égal à 0,28 moles dans l'enceinte au début du pétrissage. A cet instant le pourcentage initial d'oxygène théorique est de 20,9 % soit  $n_{O_{2t0}} = 58,5$  mmoles. Le calcul du pourcentage d' $O_2$  par la relation XVIII (prise en compte d'une différence de pression éventuelle et la mesure du pourcentage de  $CO_2$  permet de déterminer le pourcentage de  $N_2$  initial ( $\%N_2$ ), puis le nombre de moles de  $N_2$  ( $n_{N_2}$ ) présentes dans la cuve (relations XX et XXI) :

$$(XX) \quad \%N_2 = 100 - \%O_{2cp} - \%CO_2$$

$$(XXI) \quad n_{N_2} = \frac{n_T \times \%N_2}{100}$$

Par la suite, la relation XX sert à déterminer le pourcentage de  $N_2$  ( $\%N_{2(t)}$ ) dans la phase gazeuse entourant la pâte à chaque instant du pétrissage (relation XXII)

$$(XXII) \quad \%N_{2(t)} = 100 - \%O_{2cp(t)} - \%CO_{2(t)}$$



## Résultats et Discussions

Le  $N_2$  à l'état gazeux n'intervient dans aucune réaction connue, ainsi, nous considérons que le nombre de moles de  $N_2$  ( $n_{N_2}$ ) déterminé à l'état initial reste constant au cours du pétrissage. Dès lors, à partir du nombre de moles d'azote (relation XXI) et du pourcentage instantané de celui-ci (relation XXII), on peut déterminer le nombre total de moles ( $n_{T(t)}$ ) à chaque instant (relation XXIII) dont découlent les nombres de moles d' $O_2$  ( $n_{O_2(t)}$ ) (XXIV) et de  $CO_2$  ( $n_{CO_2(t)}$ ) (XXV) présents à chaque instant dans la cuve du pétrin.

|         |  |
|---------|--|
| (XXIII) | $n_{T(t)} = \frac{n_{N_2}}{\%N_{2(t)}} \times 100$                     |
| (XXIV)  | $n_{O_2(t)} = \frac{\left( n_{T(t)} \times \%O_{2cp(t)} \right)}{100}$ |
| (XXV)   | $n_{CO_2(t)} = \frac{\left( n_{T(t)} \times \%CO_{2(t)} \right)}{100}$ |

Le nombre de moles d' $O_2$  consommé dans la phase gazeuse entre l'instant initial  $t_0$  et l'instant  $t$  est donc (relation XXVI):

$$n_{O_2(t_0)} - n_{O_2(t)} = \frac{P_{t_0} \times V_g}{R \times T} \times \left[ \%O_{2(t_0)} - \left( \%O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)} \right) \times \frac{(100 - \%O_{2(t_0)} - \%CO_{2(t_0)})}{(100 - \%O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)} - \%CO_{2(t)})} \right]$$



De même, la production de CO<sub>2</sub> dans la phase gazeuse entre l'instant initial t<sub>0</sub> et l'instant t est (relation XXVII) :

$$n_{CO_2(t)} - n_{CO_2(t_0)} = \frac{P_0 \times V_g}{R \times T} \times \left[ \left( \%CO_{2(t)} \times \frac{(100 - \%O_{2(t_0)} - \%CO_{2(t_0)})}{(100 - \%O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)} - \%CO_{2(t)})} \right) - \%CO_{2(t_0)} \right]$$

Dans les relations XXVI et XXVII, les échanges gazeux sont exprimés en fonction du volume de gaz (V<sub>g</sub>), de la température dans l'enceinte (T), de la pression initiale (P<sub>t0</sub>) et de la variation de pression instantanée (ΔP<sub>(t-t0)</sub>), des valeurs de teneur gazeuses (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) affichées par l'analyseur de gaz.

En tenant compte d'une inertie d'une minute (due à l'homogénéisation), pour déterminer la consommation d'O<sub>2</sub> et la production de CO<sub>2</sub> se produisant au sein de la pâte à l'instant (t-1), les relations XXVI et XXVII deviennent :

(XXVIII)

$$n_{O_2(t_0)} - n_{O_2(t-1)} = \frac{P_0 \times V_g}{R \times T} \times \left[ \%O_{2(t_0)} - \left( \left( \%O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)} \right) \times \frac{(100 - \%O_{2(t_0)} - \%CO_{2(t_0)})}{(100 - \%O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)} - \%CO_{2(t)})} \right) \right]$$

et (XXIX)

$$n_{CO_2(t-1)} - n_{CO_2(t_0)} = \frac{P_0 \times V_g}{R \times T} \times \left[ \left( \%CO_{2(t)} \times \frac{(100 - \%O_{2(t_0)} - \%CO_{2(t_0)})}{(100 - \%O_{2(t)} - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \Delta P_{(t-t_0)} - \%CO_{2(t)})} \right) - \%CO_{2(t_0)} \right]$$

Au début du pétrissage, environ 60 mmoles d'O<sub>2</sub> sont disponibles pour alimenter les systèmes redox. Dans le sitoxygraphe, la consommation d'oxygène en fin de pétrissage se situe autour de 5 μmoles d'O<sub>2</sub>·g<sup>-1</sup> ms, soit près de 10 mmoles consommées pour une pâte témoin (composée de 2,5 kg de farine dont la teneur en eau est de 14,85 %). La quantité d'O<sub>2</sub> disponible n'est donc pas limitante puisque seulement environ  $\frac{1}{6}$  de l'O<sub>2</sub> disponible est consommé.



Correction de la mesure d'oxygène de la pression (sans la mesure de celle-ci)  
cas des pâtes non levurées

La mise en évidence de l'effet de la pression totale au sein de la cuve sur la réponse du capteur de mesure de la teneur en O<sub>2</sub> au sein de la cuve ayant été tardive (dans les 6 derniers mois de la thèse), la plupart des essais de mesure de la consommation d'O<sub>2</sub> ont été réalisées sans mesurer les variations de pression dans l'enceinte au cours du pétrissage. L'équation (III.14) exprime la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte à l'instant (t-1) en fonction des teneurs en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> affichés sur l'analyseur de gaz à l'instant t, de la température T, du volume de gaz initial V<sub>g</sub> et de la variation de pression entre l'instant initial (t<sub>0</sub>) et l'instant t. Pour une pâte non additionnée de levure, le nombre de moles de CO<sub>2</sub> produites varie peu (variation de la teneur de 0,07 % à 0,3 % entre le début et la fin du pétrissage) et peut être négligé. Si x moles d'O<sub>2</sub> sont consommées à l'instant (t-1), le nombre total de moles à l'instant (t-1) (n<sub>T(t-1)</sub>) est égal à (n<sub>T(t0)</sub> - x). De même, le nombre de moles d'O<sub>2</sub> (n<sub>O<sub>2</sub>(t-1)</sub>) vaut (n<sub>O<sub>2</sub>(t0)</sub> - x), et par suite la teneur en O<sub>2</sub> réelle (%O<sub>2réel (t-1)</sub>) dans l'enceinte du pétrin est :

$$(XXX) \quad \% O_{2réel(t-1)} = \frac{n_{O_2(t_0)} - x}{n_{T(t_0)} - x} \times 100$$

Pour établir la relation entre x et la variation de pression totale au sein de la cuve , les hypothèses suivantes sont posées :

- le volume moyen de la pâte est constant au cours du pétrissage
- la variation de température de la phase gazeuse pendant le pétrissage varie peu (quelques degrés) et est négligeable.

Dès lors, en appliquant la loi des gaz parfaits, la variation de pression au sein de la cuve (lorsque la pâte est formée) due à la consommation d'O<sub>2</sub> peut être calculée :

$$(XXXI) \quad \Delta P_{(t-t_0)} = \frac{R \cdot T}{V_g} x$$

Par suite, en remplaçant la variation de pression (XXXI) dans l'équation (XVIII), le pourcentage d'O<sub>2</sub> affiché par l'analyseur de gaz à l'instant t peut être exprimé en fonction de



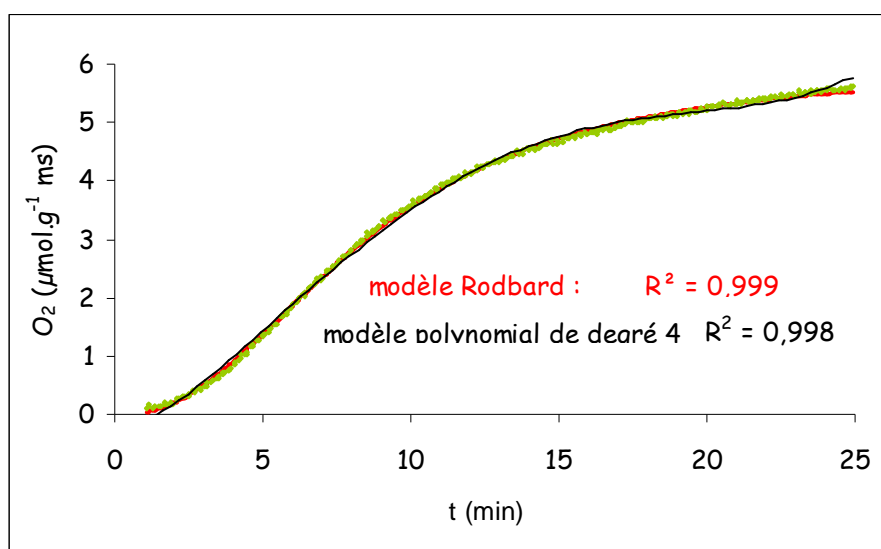


Figure 72. Choix d'un modèle de type sigmoïde pour modéliser l'évolution de la consommation d' $O_2$  au sitoxygraphe.

la consommation d'O<sub>2</sub>, du volume de gaz V<sub>g</sub> et de la température uniquement. De plus, si le temps d'homogénéisation est considéré constant et est égal à 1 min, entre 0 et 1 min de pétrissage, la consommation d'O<sub>2</sub> est nulle. Pour un instant t supérieur à 1 min, il vient :

$$(XXXII) \quad \%O_{2(t)} = \frac{n_{O_2(t_0)} - x}{n_{T(t_0)} - x} \times 100 - 2,09 \cdot 10^{-4} \times \frac{R.T}{V_g} x$$

avec,  $x = n_{O_2(t_0)} - n_{O_2(t-1)}$  pour  $t > 1$  min.

Cette expression nous permet de corriger la réponse du capteur à oxygène à tout instant de la variation de pression totale pendant l'expérimentation.

### 4.1.5 Modélisation des courbes de consommation d'O<sub>2</sub>

Dans les précédentes études réalisées au bioréacteur, les données de consommation d'O<sub>2</sub>, une fois transformées, sont modélisées par un polynôme de degré 4 pour calculer les vitesses instantanées de consommation d'oxygène en dérivant le polynôme (Eyoun, 2002). Les coefficients du modèle sont déterminés par la méthode des moindres carrés. Au bioréacteur, la modélisation est valable entre 4 et 52 min et donne généralement un coefficient de régression R<sup>2</sup> supérieur à 0,99.

Dans le cas du sitoxygraphe, cette modélisation est aussi valable, entre 0 et 23 min (inertie prise en compte) avec un R<sup>2</sup> égal à 0,998 (figure 72). Cependant, l'utilisation d'un polynôme pour modéliser les valeurs d'O<sub>2</sub> entraîne une oscillation des valeurs modélisées autour des valeurs réelles expérimentales, du fait des points d'inflexion des fonctions polynomiales. Ainsi, la dérivation des coefficients du polynôme aboutira à des vitesses instantanées de consommation soit surestimées (si la courbe théorique est au dessus des points expérimentaux comme c'est le cas en début et en fin de pétrissage) soit sous-estimées. Par ailleurs, les courbures de la courbe de consommation d'oxygène obtenues au sitoxygraphe sont plus marquées que celles obtenues au bioréacteur et par suite, le modèle polynomial s'ajuste moins bien dans ce cas. De plus, la phase de latence au tout début du pétrissage ou l'asymptote vers laquelle tendent les vitesses instantanées de consommation d'oxygène en fin de pétrissage sont variables d'une farine à l'autre, or ces données potentiellement intéressantes sont mal prises en compte par un modèle polynomial.

Etant donné, l'allure de la courbe de type sigmoïde, nous avons adapté le modèle de Rodbard (DeLean *et al.*, 1978) (relation XXXIII) pour modéliser les courbes de

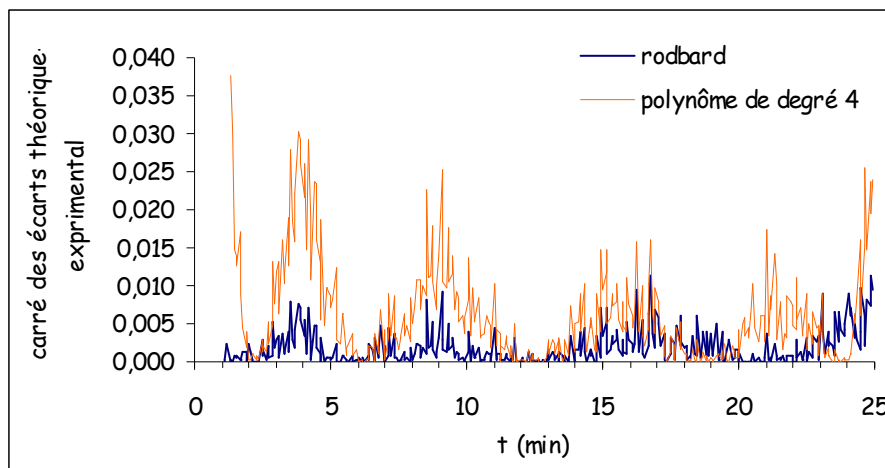


Figure 73. Evolution des écarts au carré entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées déterminées par le modèle de Rodbard et par le polynôme de degré 4.

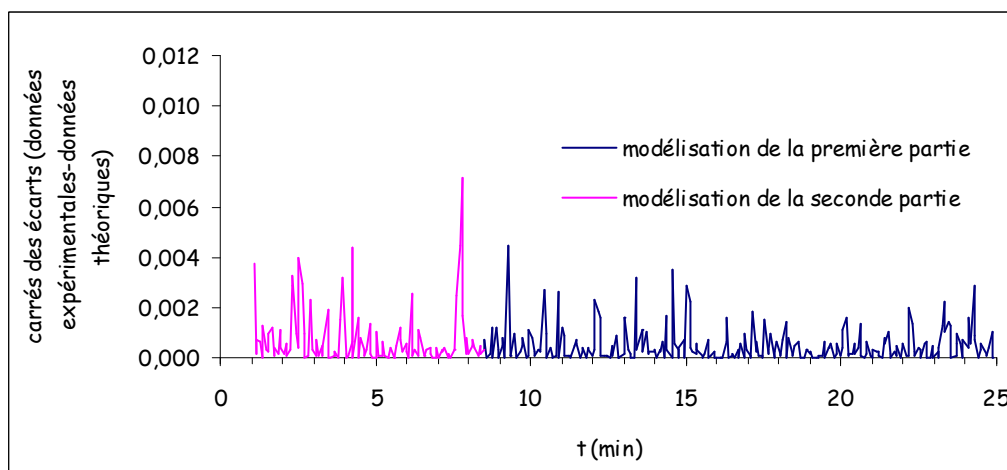


Figure 74. Evolution des écarts au carré entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées déterminées par la modélisation en deux parties (deux modèles de Rodbard) entre 0 et 10 minutes et entre 7,5 et 25 minutes.

consommation d'O<sub>2</sub>. Un tel modèle a été développé pour modéliser des courbes de type effet dose-réponse dans le domaine de la physiologie notamment.

$$(XXXIII) \quad O_2(t) = \frac{(a - d)}{\left(1 + \left(\frac{t}{c}\right)^b\right)} + d$$

Avec,

a : valeur de la consommation d'O<sub>2</sub> à un temps t infini

b : valeur négative, liée à la pente à l'origine

c : temps de ½ consommation

d : valeur de la consommation d'O<sub>2</sub> quand t tend vers 0.

Ce modèle donne un meilleur R<sup>2</sup> (0,999), avec des oscillations des données calculées autour des données expérimentales beaucoup moins marquées que pour la modélisation utilisant un modèle polynomial. Le modèle de Rodbard a donc été retenu pour la modélisation de nos courbes.

Un examen détaillé de la courbe du carré des écarts (courbe de résidus) fait encore apparaître des oscillations des valeurs calculées autour de valeurs expérimentales (figure 73). Pour remédier à cela, il est préférable de modéliser les courbes de consommation d'O<sub>2</sub> en deux parties. Un premier modèle de Rodbard est appliqué entre 0 et 10 min et le second entre 7,5 et 25 min. Le passage d'un modèle à l'autre est déterminé lorsque les valeurs des vitesses de chacun des modèles sont identiques. Dans ce cas, chaque partie du modèle aboutit à un R<sup>2</sup> supérieur à 0,999. Les écarts entre les valeurs calculées et expérimentales sont minimaux (figure 74). Cette approche, bien que relativement complexe, présente un certain nombre d'avantages :

- seule la jonction entre les deux modèles peut montrer de légères différences entre les deux modèles, mais les parties initiale et finale de la courbe d'O<sub>2</sub> sont bien modélisées, ce qui est important si l'on s'intéresse aux phénomènes qui limitent la consommation d'O<sub>2</sub> en tout début de pétrissage, par exemple ;

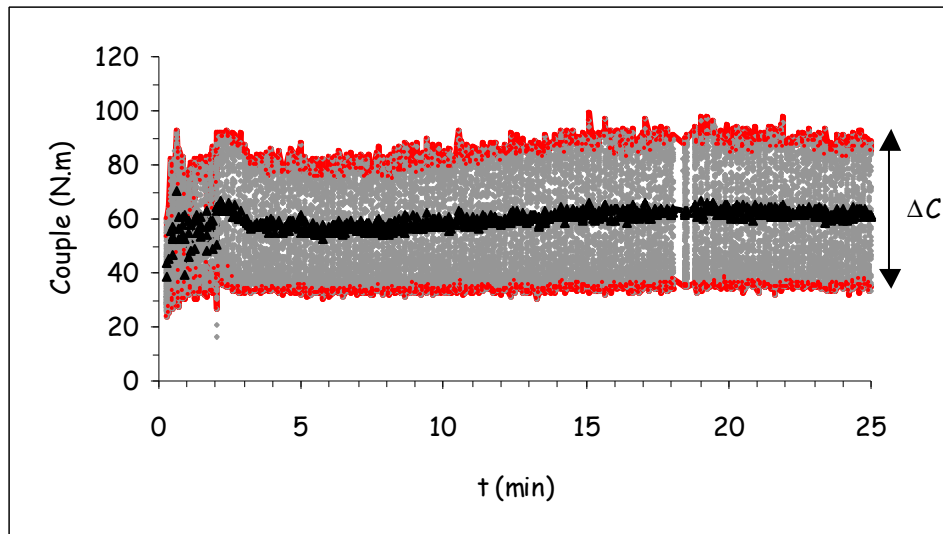


Figure 75. Exemple d'évolution d'une courbe de couple Témoin (Corde Noire spéciale hydratée à 60 %) : données brutes (en gris),  $C_{max}$  et  $C_{min}$  (en rouge), en noir ( $C_{moyen}$ ).

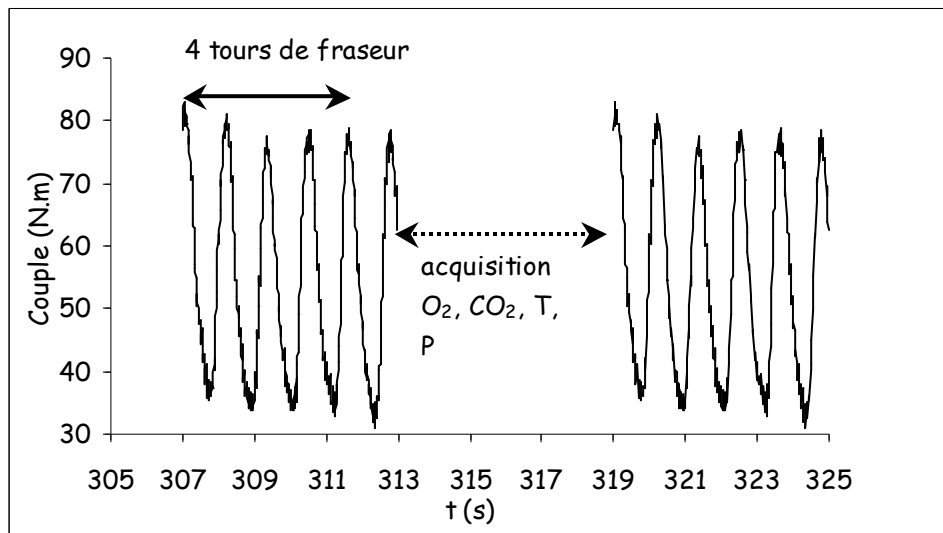


Figure 76. Exemple d'évolution du couple d'une pâte Témoin (Corde Noire spéciale hydratée à 60 %) pendant deux séquences d'acquisition rapide (6 s) alors que le bras mobile tourne à 52,5 rpm. Les parties sans données de couple sont utilisées pour acquérir les autres données (%  $O_2$ , %  $CO_2$ , température, pression) à une fréquence de 0,5 Hz.

- les valeurs calculées n'oscillent plus autour des données expérimentales, ainsi les vitesses calculées rendent compte avec une meilleure précision des pentes réelles de la courbe.

Le fait de devoir utiliser un modèle en deux parties implique la présence d'une rupture dans la courbe de consommation d'O<sub>2</sub>. Cette rupture peut correspondre à un certain nombre de phénomènes se déroulant au sein de la pâte, en particulier la diminution d'activité enzymatique (par exemple, celle de la LOX) qui traduit un changement dans la répartition de l'O<sub>2</sub> consommé par les différents système mis en jeu. La mise au point d'un modèle « idéal » n'a pas été plus approfondie, mais il est clair qu'un modèle qui permettrait d'étudier ce phénomène de rupture et le corrélérer avec des phénomènes enzymatiques ou structurels serait intéressant comme perspective de travail.

Pour systématiser le traitement et faciliter l'analyse des données, nous avons mis au point une Macro (programmée en Visual Basic for Application (VBA)) qui permet de transformer les données brutes sous forme de fichier .txt en fichiers .xls en appliquant les corrections nécessaires sur les données brutes de teneur en oxygène et en les exprimant directement en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ . Cette macro permet également d'extraire les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> aux différents temps du pétrissage.

### 4.1.6 Mesure de couple

Le système d'acquisition permet de faire une mesure de couple de façon discontinue mais à haute fréquence. En effet, il est possible d'acquérir une mesure de couple toutes les 20 ms (fréquence 50 Hz). Un exemple de courbes de couple brutes est présenté figure 75. Lorsque le bras mobile tourne à 52,5 rpm dans les conditions classiques, on a donc 57 mesures de couple pendant un tour de bras. Les fichiers de données générés étant de taille importante, l'acquisition du couple est donc réalisée de façon séquentielle, avec un intervalle de 6 s entre chaque série d'acquisition qui dure elle aussi 6 s dans la plupart des essais réalisés (figure 76).

Un certain nombre de remarques découle de l'observation des données de couple à analyser. Tout d'abord, pendant le frasage, on passe d'un milieu discontinu biphasique (poudre et liquide) à un milieu pâteux continu. Vu la forte dispersion des valeurs de couple et la faible répétabilité d'une expérience à l'autre (ce qui illustre la difficulté d'être répétable dans la phase initiale de formation de la pâte), l'analyse de couple n'est pas réalisée pendant



le frassage. Dès lors, le traitement des données de couple n'est fait qu'à partir de la troisième minute de pétrissage (démarrage de la grande vitesse).

Par ailleurs, l'analyse des signaux obtenus montre que l'on peut extraire l'enveloppe de la courbe, soit une courbe de minimum ( $C_{\min}$ ) et une courbe de couple maximum ( $C_{\max}$ ) (Celhay, 2000). De façon plus précise que Celhay (2000), nous pouvons mesurer l'évolution du couple au cours d'un tour du bras mobile (figure 76). Le couple semble atteindre la valeur  $C_{\max}$  lorsque le bras mobile passe à proximité du bras fixe et la valeur de  $C_{\min}$  lorsqu'il en est le plus éloigné. Les effets observés sur les variations de la valeur de couple sont mesurables aussi bien sur les minima que sur les maxima, ce qui permet de définir une valeur moyenne du couple ainsi que l'épaisseur de la courbe par les relations XXXIV et XXXV respectivement :

$$(XXXIV) \quad C_{\text{moy}} = \frac{C_{\text{MAX}} + C_{\text{min}}}{2}$$

avec ,

$C_{\text{moy}}$  : couple (en N.m) moyen.

$C_{\text{MAX}}$  : valeur maximale du couple (en N.m) au cours d'un tour de bras

$C_{\text{min}}$  : valeur minimale du couple (en N.m) au cours d'un tour de bras.

$$(XXXV) \quad \Delta C = C_{\text{MAX}} - C_{\text{min}}$$

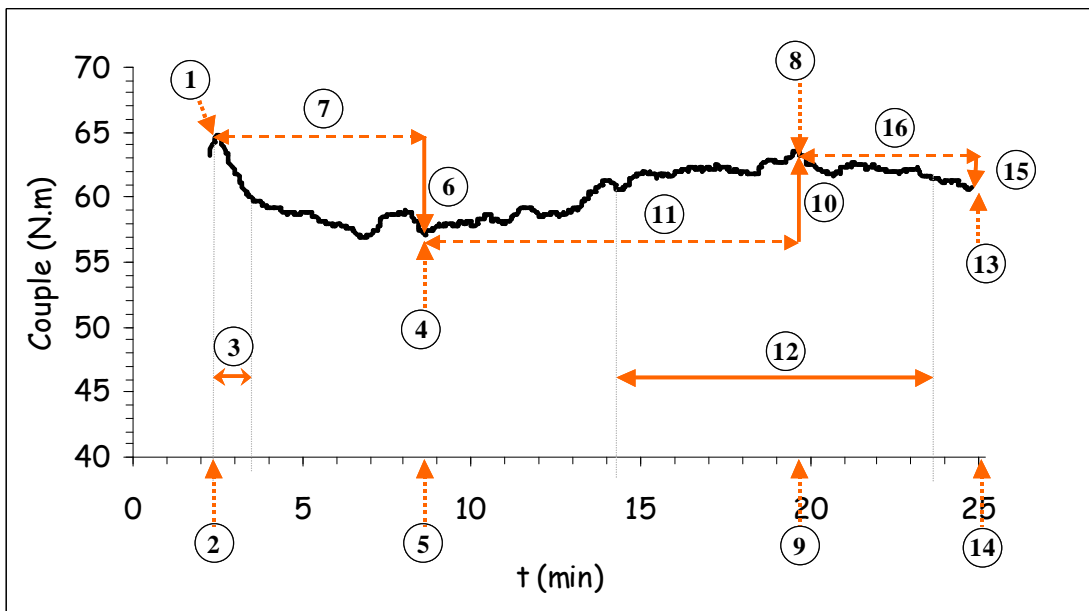
avec ,

$\Delta C$  : épaisseur du couple en N.m

$C_{\text{MAX}}$  : valeur maximale du couple au cours d'un tour de bras en N.m

$C_{\text{min}}$  : valeur minimale du couple au cours d'un tour de bras en N.m





| Nomenclature    | CM1 | tM1 | St1 | Cm1 | tm1 | Af1 | tA1 | CM2 | M2 | Raf | tRa | St2 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| n° du paramètre | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9  | 10  | 11  | 12  |

| Nomenclature    | Cm2 | tm2 | Af2 | tA2 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| n° du paramètre | 13  | 14  | 15  | 16  |

Figure 77. Définition des paramètres (nomenclature et n° utilisé) étudiés sur les données de couple (exemple de courbe de couple moyen obtenue sur une pâte de Corde Noires spéciale).

Ayant constaté la présence fréquente (après la phase de frasage) de 2 maxima de consistance avec une remontée éventuelle de cette dernière en fin de pétrissage, nous avons défini, pour l'analyse des courbes de couple (moyen et épaisseur), différents paramètres dans les phases initiale et avancée de pétrissage (figure 77) soit un total maximum de 2 fois 16 paramètres :

- 2 paramètres de consistance maximale, CM1 (1) et CM2 (8), ainsi que leur temps d'apparition correspondant, tM1 (2) et tM2 (9) ;
- 2 paramètres de stabilité (St1 (3) et St2 (12)) correspondant à la durée en min pendant laquelle le couple est supérieur à 95 % de la valeur maximale ;
- 2 paramètres de consistance minimale, Cm1 (4) et Cm2 (13), ainsi que leur temps d'apparition correspondant tm1 et tm2 ;
- 3 paramètres de variation de consistance, un de raffermissement après le premier maximum soit  $Raf = CM2 - Cm1$  (10) avec la durée (tRa,) correspondante (11) et 2 d'affaiblissement ( $Af1 = CM1 - Cm1$  (6) et  $Af2 = CM2 - Cm2$  (15)) avec les durées (tA1 et tA2) correspondantes (7) et (16).

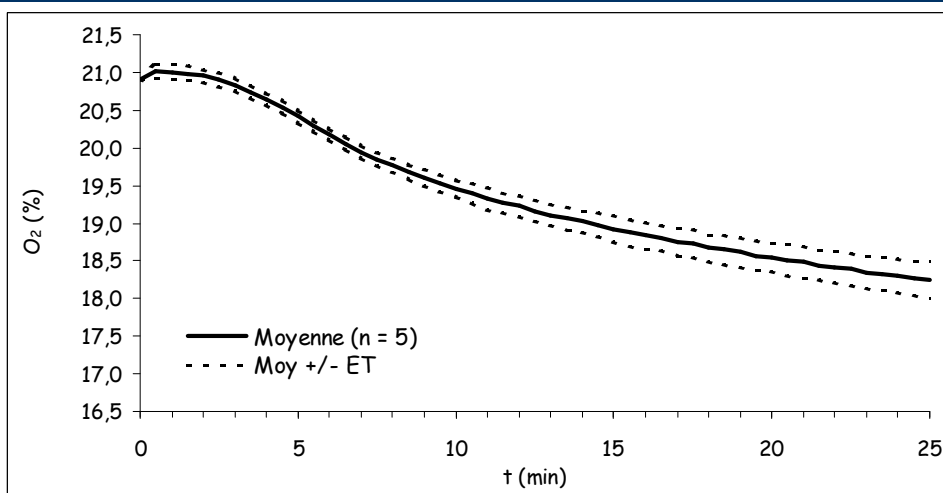


Figure 78. Evolution moyenne de la consommation d'oxygène d'une pâte témoin (2,5 kg de farine BPFM, 60 % d'eau, 1,8 % de NaCl)

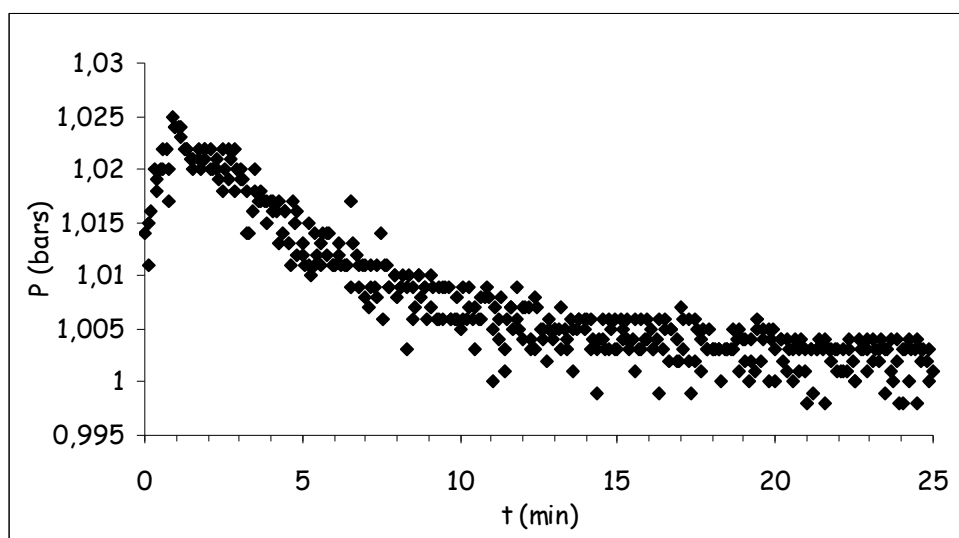


Figure 79. Evolution de la pression (données brutes) d'une pâte Témoin obtenue à partir de 2,5 kg de farine BPFM hydratée à 60 % et contenant 1,8 % de NaCl

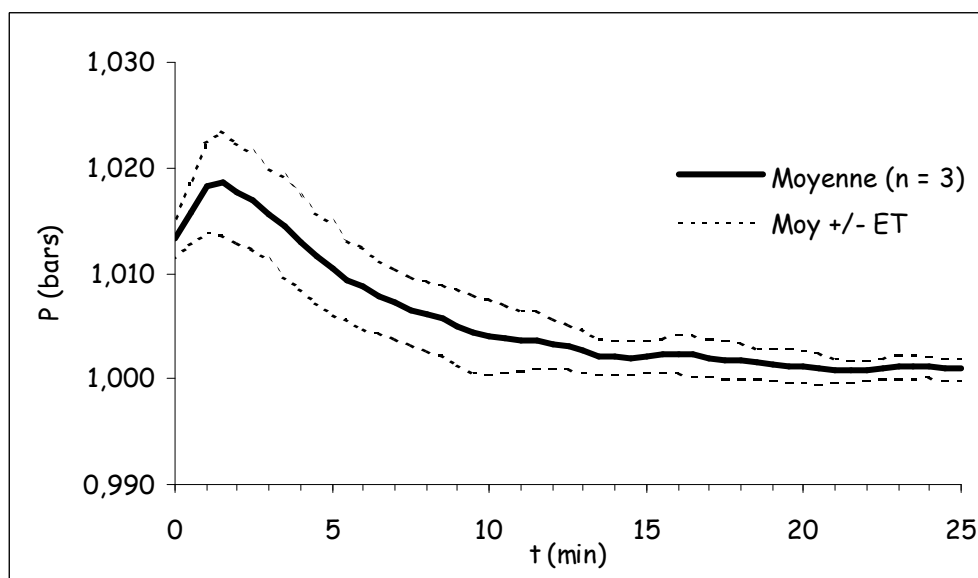


Figure 80. Evolution moyenne de la variation de pression au sein de la cuve lors du pétrissage d'une pâte témoin (2,5 kg de farine BPFM, 60 % d'eau, 1,8 % de NaCl) pendant 25 min (2 min de frassage à 30 rpm et 23 min de pétrissage à 52,5 rpm)

---

## **4.2 Etude d'une pâte témoin pétrie au sitoxygraphe**

Le terme « pâte témoin » utilisé dans les chapitres suivants sous entend que la pâte est pétrie pendant 25 min, comprenant 2 min de frasage à la vitesse de rotation du bras de 30 rpm suivies de 23 min de pétrissage à vitesse rapide (52,5 rpm).

### **4.2.1 Répétabilité de la mesure de consommation d'oxygène de la pâte témoin**

La farine témoin utilisée dans ce paragraphe est la farine BPMF (Base boulangère panifiable pour la Meunerie Française). Les caractéristiques de cette farine sont résumées dans le chapitre Matériel & Méthodes. Nous avons mesuré la consommation d'oxygène de 5 pâtes témoins. La courbe moyenne présentée figure 78 est obtenue à partir de courbes brutes mesurées indépendamment du jour, et du sac dans lequel la farine BPMF est conditionnée. Le CV maximal, toujours inférieur à 1,33 % (obtenu à  $t = 25$  min) montre une très bonne répétabilité des expériences. Le CV est même inférieur à 1 % jusqu'au temps  $t = 15$  min de pétrissage. Des essais de répétabilité fait au bioréacteur montraient qu'on obtient un CV allant jusqu'à 12 % dans la phase initiale de pétrissage (Eyoun, 2002), les CV étant plus faibles au fur et à mesure de la progression du pétrissage ( $CV < 3,3$  % en fin de pétrissage). Au vu de ces résultats, avec le sitoxygraphe, nous pouvons espérer détecter des variations de consommation d'oxygène et caractériser très finement le comportement des pâtes et ce dès les premiers instants de pétrissage de façon plus précise qu'au bioréacteur.

### **4.2.2 Répétabilité de la mesure de pression**

Le signal délivré par le capteur de pression au cours du pétrissage d'une pâte témoin est donné dans l'exemple de la figure 79. L'ensemble de points obtenus par la mesure montre que le signal est fortement bruité, l'amplitude du bruit se situe entre 5 et 10 mbar (~8 mbar). Il est possible que ce bruit corresponde à des positions différentes du bras mobile au moment de l'acquisition du signal issu du capteur de pression. En conséquence, les données subissent un premier traitement de façon à éliminer les valeurs aberrantes, puis la courbe d'évolution de la pression est lissée par une moyenne glissante sur les valeurs. Le pré-traitement des données est réalisé par une fonction Macro spécialement développée. L'allure de la courbe moyenne (sur trois pétrissages identiques) d'évolution de la pression est décrite figure 80.

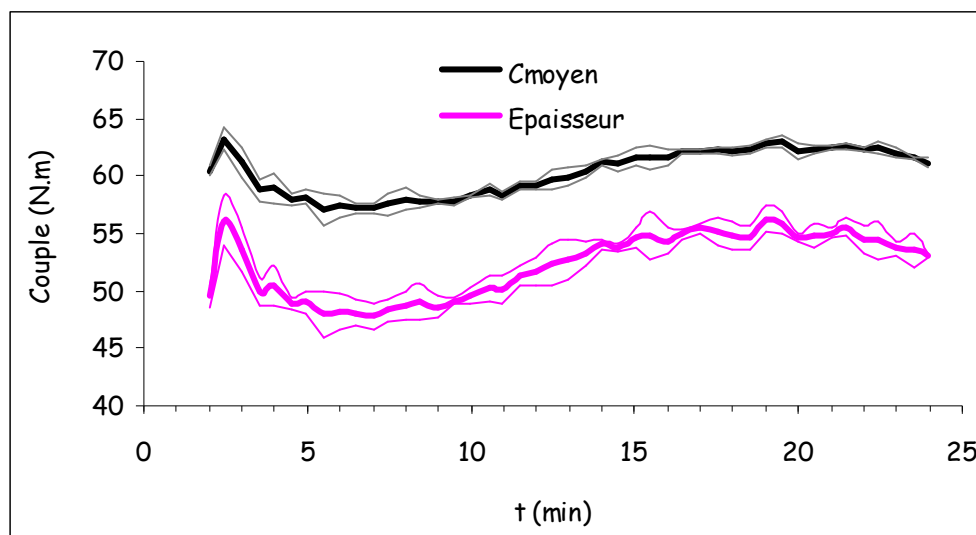


Figure 81. Evolution moyenne du couple moyen (noire) et de l'épaisseur du couple (rose) au sein de la cuve lors du pétrissage d'une pâte Témoin (2,5 kg de farine CNS, 60 % d'eau, 1,8 % de NaCl) pendant 25 minutes (2 min de frassage à 30 rpm et 23 minutes de pétrissage à 52,5 rpm). En trait fin, les courbes moyennes  $\pm$  ET sont représentées..

Tableau 23. Paramètres extraits des courbes de couple Témoin (moyen et épaisseur) d'une pâte formée à partir de Corde Noire spéciale

|                     | CM1         | tM1         | St1        | Cm1         | tm1         | Af1         | tAf         |            |            |
|---------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| <b>Couple moyen</b> | <b>63,9</b> | <b>2,5</b>  | <b>0,5</b> | <b>56,4</b> | <b>5,5</b>  | <b>7,6</b>  | <b>3,1</b>  |            |            |
| <i>ET</i>           | 0,7         | 0,1         | 0,1        | 0,7         | 1,3         | 0,7         | 1,4         |            |            |
| <b>Epaisseur</b>    | <b>56,9</b> | <b>2,5</b>  | <b>0,3</b> | <b>46,9</b> | <b>6,1</b>  | <b>10,0</b> | <b>3,6</b>  |            |            |
| <i>ET</i>           | 2,0         | 0,1         | 0,1        | 1,4         | 2,3         | 0,7         | 2,3         |            |            |
|                     | CM2         | tM2         | Raf        | tRa         | St2         | Cm2         | tm2         | Af2        | tAf        |
| <b>Couple moyen</b> | <b>63,5</b> | <b>20,3</b> | <b>7,1</b> | <b>7,1</b>  | <b>11,1</b> | <b>61,0</b> | <b>24,1</b> | <b>2,5</b> | <b>3,8</b> |
| <i>ET</i>           | 0,3         | 1,6         | 0,5        | 2,1         | 0,5         | 0,4         | 0,3         | 0,2        | 1,8        |
| <b>Epaisseur</b>    | <b>56,7</b> | <b>19,2</b> | <b>9,8</b> | <b>4,4</b>  | <b>8,8</b>  | <b>52,4</b> | <b>23,7</b> | <b>4,3</b> | <b>4,5</b> |
| <i>ET</i>           | 1,1         | 0,1         | 1,4        | 1,5         | 1,7         | 0,7         | 0,3         | 0,4        | 0,4        |

Pour chaque pâte témoin, le maximum de pression est atteint au-delà d'une min de pétrissage, c'est-à-dire lorsque toute la pâte peut être considérée comme un milieu viscoélastique macroscopiquement homogène. La pression maximale moyenne est atteinte après 1,5 min de pétrissage. Etant données les variations de la réponse du capteur (probablement imputable aux variations de la pression atmosphérique dues au changement de climat), il existe une relative dispersion des réponses de mesure de pression. Cependant, le CV ne dépasse jamais 0,6 % sur l'étendue de la courbe.

### 4.2.3 Répétabilité de la mesure de couple

La répétabilité présentée sur la figure 81 est déterminée après trois répétitions de pétrissage d'une pâte formée à partir de farine Corde Noire Spéciale pétries lors d'expériences différentes.

Pour chaque pâte témoin, les maxima de couple ( $CM1_{moy}$  et  $CM1_{ep}$ ) sont atteints dès le début du pétrissage ( $tM1_{moy}$  et  $tM1_{ep} < 2$  min 30 s) (tableau 23). Les minima de couple dans la phase initiale ( $Cm1_{moy}$  et  $Cm1_{ep}$ ) sont atteints vers 6 min de pétrissage ( $tm1_{moy}$  et  $tm1_{ep}$ ). Le seconde pic de consistance ( $CM2_{moy}$  et  $CM2_{ep}$ ) apparaît vers 20 min ( $tM2_{moy}$  et  $tM2_{ep}$ ). A la fin du pétrissage, les courbes de couple se situent dans la zone d'affaiblissement ( $Cm2$ ,  $tm2$ ,  $Af2$ ,  $St2$  et  $tA2$  ne peuvent être déterminés). Pour chaque courbe, la stabilité dans la phase initiale est courte ( $St1_{moy}$  et  $St1_{ep} < 30$  s) tandis que l'affaiblissement initial ( $Af1_{moy}$  et  $Af1_{ep}$ ) se produit sur une durée relativement longue ( $tA1_{moy}$  et  $tA1_{ep} > 3$  min). Un raffermissement important ( $Raf_{moy}$  et  $Raf_{ep}$  se produisent pendant une durée comprise entre 4 et 7 min ( $tRa_{moy}$  et  $tRa_{ep}$ )). Pour les valeurs de couple, la répétabilité est excellente puisque le CV ne dépasse jamais 2,4 % sur l'ensemble de la courbe. Globalement, la répétabilité reste satisfaisante pour les différences de couple ( $Af1$  et  $Raf$ ) et les temps associés aux maxima ( $tM1$  et  $tM2$ ) avec des CV inférieurs à 10 % alors qu'elle est médiocre pour  $St1$ ,  $tm1$ ,  $tA1$  et  $tRa$ . Pour ces trois derniers paramètres, cette mauvaise répétabilité est due à la difficulté de positionner la valeur de  $tm1$  alors que pour  $St1$  cela est dû à une détermination d'une durée relativement courte dans une zone où la valeur de couple varie rapidement.

### 4.2.4 Maturation de la farine témoin

A la réception, la farine BPMF reçue était fraîchement produite au moulin. Pour des raisons de logistique, il a été impossible de conserver la totalité de la farine BPMF à  $-20$  °C, température qui garantit la stabilité des propriétés boulangères des farines. Nous avons fait le



choix de conserver celle-ci dans des sacs hermétiques à l'abri de la lumière à 4 °C. Conscients des modifications biochimiques qui peuvent se produire dans ces conditions de stockage, nous avons pris soin de faire un essai témoin pour chaque série d'expériences réalisées, de façon à rendre comparable nos observations.

### **4.2.5 Optimisation des conditions de pétrissage**

#### **4.2.5.1 *Avis de l'homme de l'art***

Les premiers essais de pétrissage au sitoxygraphe ont été réalisés en présence d'un maître boulanger. La particularité du sitoxygraphe tient dans le fait que toute ou presque toute la pâte est pétrie à chaque tour de bras, contrairement aux pétrins de type spirale ou oblique qui ne pétrissent qu'une partie de la pâte, l'autre partie étant au repos pendant un tour de cuve. Ainsi, dans le sitoxygraphe, la pâte est constamment et rapidement homogénéisée (1 min) pendant le pétrissage, mais aussi lors de la formation de celle-ci, puisque moins d'une minute est nécessaire pour former la pâte à la vitesse de frassage de 30 rpm. En accord avec l'avis du maître boulanger, nous avons fixé la période de frassage à 2 min à une vitesse de 30 rpm, c'est-à-dire 2 fois moins de temps que sur un pétrin oblique et à une vitesse inférieure.

Par la suite, nous avons pétri une farine Corde Noire à la vitesse de 60 rpm. D'après le comportement de la pâte au pétrissage, évaluée au toucher par le boulanger, le temps optimal de pétrissage est de 15 min et l'hydratation adéquate est de 60 %. Dans la suite des travaux, nous avons décidé de systématiquement pétrir la pâte pendant 10 min supplémentaires, portant le temps total de pétrissage à 25 min.

#### **4.2.5.2 *Etude de quelques paramètres de pétrissage***

Afin de modéliser les influences relatives de chacun des paramètres physico-chimiques de pétrissage (vitesse du bras, hydratation, température de départ des ingrédients) sur les échanges gazeux, le comportement rhéologique des pâtes et les échanges énergétiques ayant lieu entre le moteur, la pâte et la double enveloppe du pétrin, la méthode des plans d'expériences a été utilisée (tableaux 18 et 19).

##### **4.2.5.2.1 Effet de la vitesse, de l'hydratation et de la température des ingrédients sur la consommation d'O<sub>2</sub>**

L'influence des paramètres de pétrissage sur la consommation d'O<sub>2</sub> et sur les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> a été étudiée au cours du pétrissage d'une farine Corde



**Tableau 24. Importance relative des facteurs (valeurs des coefficients exprimées en pourcentage de la moyenne) étudiés dans le plan d'expérience sur la mesure de consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte (seul les coefficients significatifs avec un intervalle de confiance de 95 % sont représenté)**

|                |                 | O <sub>2total</sub> | V <sub>2,5</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>6</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>8</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>10</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>14</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>22</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>24</sub> O <sub>2</sub> |
|----------------|-----------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>moyenne</b> | b <sub>0</sub>  | <b>3,42</b>         | <b>0,082</b>                    | <b>0,278</b>                  | <b>0,323</b>                  | <b>0,221</b>                  | <b>0,169</b>                   | <b>0,137</b>                   | <b>0,115</b>                   | <b>0,099</b>                   | <b>0,086</b>                   | <b>0,077</b>                   | <b>0,069</b>                   | <b>0,063</b>                   |
| <b>Vrot</b>    | b <sub>1</sub>  | <b>7,2</b>          | <b>35,6</b>                     | <b>25,8</b>                   | <b>13,6</b>                   |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| <b>Hyd</b>     | b <sub>2</sub>  | <b>-2,9</b>         | <b>-25,4</b>                    | <b>-6,3</b>                   |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| <b>T</b>       | b <sub>3</sub>  |                     | <b>16,2</b>                     | <b>3,8</b>                    |                               |                               |                                | <b>0,002</b>                   |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| Vrot / Hyd     | b <sub>12</sub> |                     |                                 |                               |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| Vrot / T       | b <sub>13</sub> |                     |                                 |                               |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| Hyd / T        | b <sub>23</sub> |                     |                                 |                               |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| Vrot           | b <sub>11</sub> |                     |                                 |                               |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| Hyd            | b <sub>22</sub> |                     | <b>0,010</b>                    |                               |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |
| T              | b <sub>33</sub> |                     |                                 |                               |                               |                               |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                                |

Noire Spéciale 2004 (tableau 24). Les résultats montrent que seules la consommation totale d'O<sub>2</sub> et les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> inférieures à 8 min sont influencées par les facteurs étudiés.

Parmi les facteurs qui influent sur la consommation finale d'O<sub>2</sub>, la vitesse joue le rôle le plus important ( $b_1 = 7,2$  % de la valeur moyenne) alors que l'effet de l'hydratation sur la réponse est de signe opposé et 2,5 fois plus faible ( $b_2 = -2,9$  %). La température de départ des ingrédients n'influence pas la consommation finale d'O<sub>2</sub> de la pâte. L'examen des coefficients obtenus confirme ces observations. Jusqu'à 8 min de pétrissage, la vitesse du bras a une influence linéaire positive sur la vitesse de consommation d'oxygène. De plus, cette influence est plus importante au tout début du pétrissage ( $b_1 = 36$  % à  $t = 2,5$  min contre 14 % à  $t = 6$  min). Pour des temps inférieurs à 6 min, la vitesse de consommation d'oxygène par les systèmes redox est influencée de façon négative par la proportion d'eau ajoutée à la farine et de façon positive par la température des ingrédients. Enfin, l'influence de ces deux facteurs est également la plus importante en début de pétrissage ( $t = 2,5$  min). L'ensemble de ces résultats est cohérent avec ceux décrits dans la littérature (Ameille, 1998 ; Celhay, 2000 ; Eyoum, 2002), à savoir :

- ✓ plus la température est élevée (dans notre domaine le maximum est de 20 °C), plus la vitesse de consommation est importante en début de pétrissage, en raison de l'accroissement de l'activité enzymatique ;

- ✓ plus l'hydratation est faible, plus la concentration en substrat est importante et par là-même l'activité enzymatique des systèmes redox ;

- ✓ l'apport d'O<sub>2</sub> est limitant en début de pétrissage.

Lors du pétrissage de la pâte, les enzymes (principalement le système lipoxygénasique) utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats endogènes de la pâte et initier des réactions d'oxydoréduction couplées (oxydation des caroténoïdes, formation de ponts diS). Le pétrissage va apporter l'oxygène nécessaire aux réactions d'oxydation tout en favorisant les contacts enzymes-substrats et les réarrangements inter/intra moléculaires protéiques. La forte influence (35 %) de la vitesse de rotation du bras en est le témoin.

Dans une moindre mesure, l'hydratation contrôle la concentration en substrats redox au sein de la pâte. Dans notre domaine d'étude, la proportion d'eau ajoutée à la farine varie entre 57 et 63 %. La teneur en acides gras polyinsaturés oxydables de la farine étudiée (Corde Noire spéciale, voir figure 99 p 262) est de  $3,37 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  ms. En exprimant cette quantité par gramme d'eau présente dans la pâte, on a une variation d'environ 8 % de la concentration entre la pâte la plus hydratée et la moins hydratée. La variation de



l'hydratation modifie par ailleurs la mobilité des molécules, et plus le milieu est dilué, plus la mobilité moléculaire est importante. Dès lors, l'augmentation de la concentration en substrat et la diminution de la mobilité liées à la diminution de l'hydratation devraient avoir un effet opposé sur la vitesse de consommation d'oxygène. Etant donnée l'importance des réactions d'oxydoréduction dans la structuration et les propriétés rhéologiques des protéines, ces observations, si elles confirment l'importance de l'hydratation de la farine, paraissent difficilement explicables par son effet sur les paramètres concentrations et mobilités de réactants.

L'activité enzymatique dépendant de la température du milieu, elle est aussi affectée en début de pétrissage par la température. En effet, pour  $V_{2,5O_2}$ , la vitesse de consommation d'oxygène s'accroît de 30 % entre 10 et 20 °C. Barone *et al.* (1999) montrent qu'entre 10 et 20 °C, l'activité Lox purifiée extraite de la semoule de blé dur mesurée à pH = 6,8 augmente d'environ 30 % d'activité, l'activité maximale étant obtenue à 40 °C. Nicolas et Drapron (1981) citent plusieurs références qui traitent de l'étude de la température sur l'activité de la LOX (de fève, de soja et d'orge). En général, dans le cas de la LOX de blé, la mesure est réalisée à 25-30 °C. On peut aisément imaginer que le fait de pétrir la pâte provoque un échauffement de celle-ci, estompant probablement l'effet de la température de départ très rapidement. Par ailleurs, le fait d'hydrater les particules de farines entraîne une forte augmentation de la température de pâte de l'ordre de 5 °C (confirmé avec les observations sur les mesures de températures de pâte).

De la même façon, les effets de la vitesse et de l'hydratation s'estompent après le début du pétrissage. La limitation en  $O_2$  étant prépondérante en début de pétrissage, il est possible qu'elle masque l'effet de l'hydratation puisqu'il manque un des substrats nécessaires aux réactions mesurées. Ainsi, l' $O_2$ , dès qu'il est mis en contact avec les systèmes redox, est immédiatement consommé. En même temps, cette consommation d' $O_2$  s'accompagne d'une diminution d'acides gras polyinsaturés, transformés en hydroperoxydes, avec l'apparition transitoire d'espèces radicalaires qui vont progressivement dénaturer la LOX et réduire son activité. Ainsi, les résultats de Castello (1999) ont montré que la quasi-totalité des acides gras polyinsaturés libres étaient consommés dans les 10 premières min de pétrissage au consistographe. De même, l'activité lipoxygénasique diminue rapidement. Delcros *et al.* (1998) montrent que dans une pâte pétrie au consistographe®, 60 % de l'activité LOX est perdue après 2 min de pétrissage et 75 % de l'activité LOX est perdue après 5 min. Ainsi, la limitation de la disponibilité de l'oxygène pour les réactions redox est remplacée par celle d'une moindre activité LOX et d'une quantité de PUFA oxydables faible, ce qui explique en

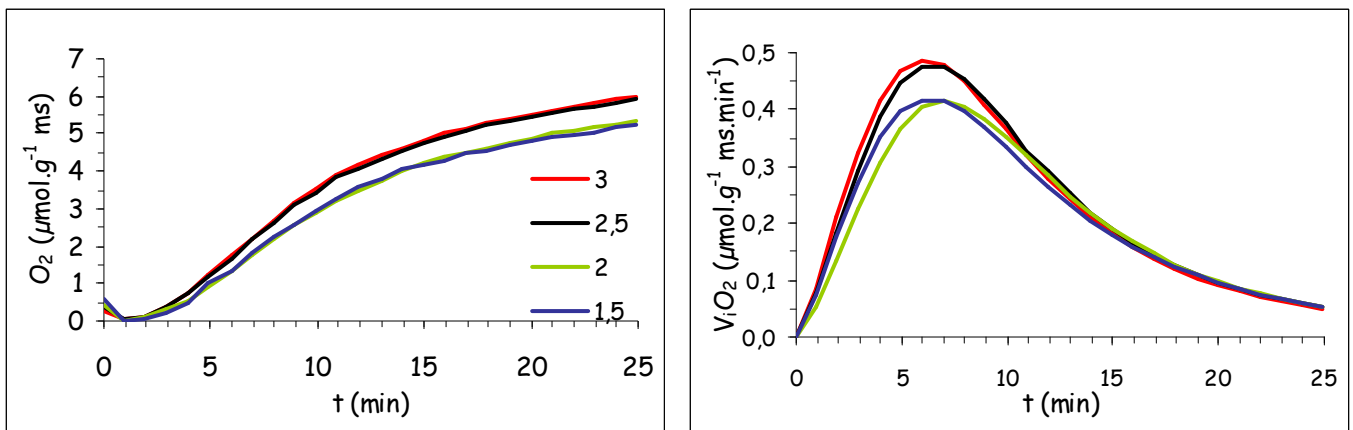


Figure 82. Effet de la masse de pâte sur la consommation (A.) et sur les vitesses de consommation d' $O_2$  (B.) au cours du pétrissage de 1,5 - 2 - 2,5 et 3 kg de farine BPMF avec le sitoxygraphe

partie le fait que les facteurs étudiés n'ont plus aucune influence sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> après 8 min de pétrissage. Ces auteurs décrivent également un effet protecteur de l'hydratation sur la perte en activité lipoxygénasique et un effet activateur de la vitesse (Delcros *et al.*, 1998).

En extrapolant ces résultats au sitoxygraphe, il est donc probable que l'essentiel des PUFA libres soient oxydés après 8 min de pétrissages, de même la majeure partie de l'activité LOX doit être perdue à ce stade du pétrissage. Par ailleurs, les trois facteurs étudiés ont des effets linéaires et indépendants sur la consommation d'oxygène mesurée avec le sitoxygraphe.

### 4.2.5.2.2 Effet de la masse de pâte et du volume de phase gazeuse

#### 4.2.5.2.2.1 Sur la consommation d'O<sub>2</sub> mesurée au sitoxygraphe

Dans ce chapitre, le volume de gaz entourant la pâte a été modifié pendant le pétrissage de façon à étudier l'impact du rapport  $V_{\text{gaz}}/V_{\text{pâte}}$  sur la consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte. Pour chaque pétrissage, 60 g d'eau distillée pour 100 g de farine humide sont ajoutés et la teneur en NaCl est de 1,8 g pour 100 g de farine humide. Les conditions de pétrissage sont les conditions de la pâte témoin. D'une part, nous avons fait varier la masse totale de pâte entre 2,4 et 4,9 kg (correspondant respectivement à des masses de farine comprises entre 1,5 et 3 kg), puis, d'autre part, nous avons réduit le volume mort gazeux de la cuve en ajoutant une pièce plastique pleine dans la partie supérieure de la cuve, permettant de réduire le volume gazeux de 0,96 L (voir § III.2).

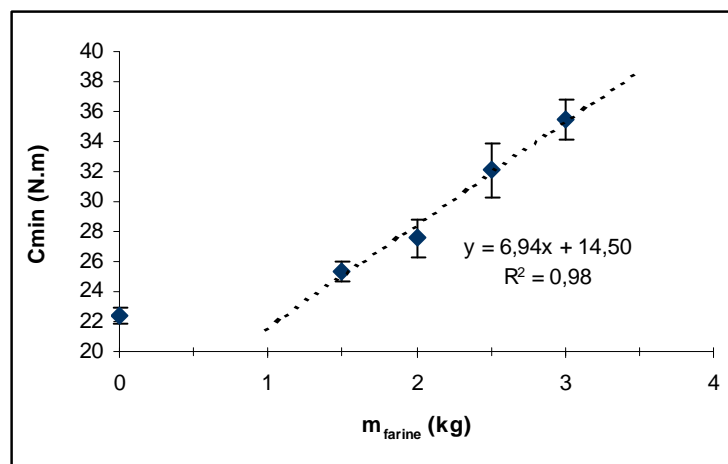
Lorsque la masse de pâte varie, deux tendances se dégagent dans les consommations d'O<sub>2</sub> mesurées (figure 82). En effet, l'allure des courbes de consommation et des courbes de vitesses instantanées de consommation sont identiques pour 1,5 et 2 kg ainsi que pour 2,5 et 3 kg de farine. La différence entre ces essais se situe uniquement dans la valeur de la vitesse maximale de consommation d'O<sub>2</sub> atteinte (figure 82.B.), autour de 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}\cdot\text{min}^{-1}$  pour des masses de farine supérieures à 2,5 kg et environ 0,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}\cdot\text{min}^{-1}$  pour des masses de farine inférieures à 2,5 kg. Il est surprenant de voir un effet seuil : en effet, au sitoxygraphe, le pétrissage d'une masse de pâte supérieure à 2 kg se traduit par une augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub>.

Nous avons introduit la pièce plastique dans la cheminée du pétrin seulement pour les essais avec 2,5 et 3 kg de farine. Les résultats obtenus avec la pièce plastique sont strictement les mêmes que ceux obtenus en son absence (non montrés). Dans ces expériences, le rapport  $V_{\text{gaz}}/V_{\text{pâte}}$  n'influence donc pas les échanges gazeux entre la pâte et l'atmosphère pour un

**Tableau 25** Représentation du Volume de la phase gazeuse ( $V_{\phi g}$ ) et de la quantité d' $O_2$  disponible au sein de la cuve en fonction de la masse de farine et/ou de la réduction du volume mort par l'ajout de la pièce plastique

| $m_{\text{farine}}$ (kg) | $V_{\phi g}$ (L) | $O_2$ ( $\mu\text{moles.g}^{-1} \text{ms}$ ) |
|--------------------------|------------------|--|
| 1,5                      | 8,7              | 59   |
| 2                        | 8,3              | 42   |
| 2,5                      | 7,9              | 32   |
| 3                        | 7,5              | 26   |
| <b>2,5</b>               | 6,9              | 28   |
| <b>3</b>                 | 6,6              | 22   |

en gras, les expériences réalisées en présence de la pièce plastique



**Figure 83.** Effet de la masse de farine humide ajoutée dans le sitoxygraphe (quantité d'eau ajoutée constant = 60 %), quantité de NaCl constante = 1,8 %) sur la valeur du  $C_{\text{min}}$ .

même volume de pâte. Si on compare la part d'O<sub>2</sub> consommée par la pâte avec la part d'O<sub>2</sub> disponible au départ au sein de la cuve (tableau 25), on montre qu'en présence de la pièce plastique, la plus grande quantité de pâte (3 kg de farine) consomme au maximum 26 % de l'oxygène de départ. L'O<sub>2</sub> n'est donc jamais limitant. L'intérêt de la pièce plastique réside donc uniquement dans le fait d'améliorer la sensibilité de la mesure de la consommation d'O<sub>2</sub>, puisqu'elle provoque des variations de teneurs en O<sub>2</sub> plus importantes (par exemple le mesureur de gaz affiche une valeur de 16,4 % en fin de pétrissage avec la pièce plastique alors qu'en son absence, il affiche 17,5 % dans le cas du pétrissage d'une pâte réalisée à partir de 2,5 kg de farine). Aucune différence d'inertie n'est constatée sur les courbes de consommation d'O<sub>2</sub> avec ou sans la pièce plastique. Il est probable que la diminution du volume de phase gazeuse à homogénéiser est compensée par une moins bonne efficacité de la pompe de l'analyseur pour la circulation du gaz dans la cuve.

L'écart d'O<sub>2</sub> consommé par gramme de matière sèche entre masses élevées et faibles de pâte pourrait s'expliquer par une efficacité moindre du pétrin lorsqu'il est peu chargé. La surface d'échange gaz-pâte est dépendante de la masse de farine mais aussi de la façon dont les bras étirent et compriment la pâte. Il apparaît alors que pour des masses de pâte de 4 kg (2,5 kg de farine), le pétrissage (à une vitesse de 52,5 rpm) favorise l'incorporation d'O<sub>2</sub> dans la pâte, au-delà de cette masse, alors qu'en dessous de cette masse, l'incorporation est limitante. Certains auteurs ont étudié l'importance de l'aération lors du pétrissage des pâtes (Campbell *et al.*, 1998 ; Campbell *et al.*, 2001). En effet, les alvéoles gazeux sont présents dès la formation de la pâte par inclusion de *nuclei* d'air (diamètre variant de 10 à 100 µm) et sont cruciaux pour initier leur gonflement lors de la fermentation. Dans le contexte de l'étude des systèmes redox, ces *nuclei* sont aussi un moyen de fournir de l'oxygène aux systèmes enzymatiques dans la pâte. Il serait intéressant de faire une étude similaire avec d'autres types de bras mobiles pour comparer les efficacités d'incorporation d'O<sub>2</sub>.

#### 4.2.5.2.2.2 Sur les courbes de couple C<sub>min</sub> et C<sub>MAX</sub>.

En fonction de la masse de farine humide ajoutée dans la cuve du pétrin, respectivement 1,5 – 2 – 2,5 et 3 kg de farine, nous obtenons des allures de courbes de couple moyen relativement similaires, en revanche, les valeurs de couple min et max sont différentes.

En premier lieu, la masse de farine de départ influence évidemment la valeur du C<sub>min</sub>. La variation du C<sub>min</sub> pendant le pétrissage est faible. Pour chaque essai, la valeur de C<sub>min</sub> moyen a été exprimée entre le début du pétrissage (après 2 min de frasage) et la fin de celui-ci. La figure 83 montre que la valeur du C<sub>min</sub> est constante au cours du pétrissage (CV < 5,5 %



Tableau 26. Effet de la masse de farine sur les maxima et minima extraits de la courbe de couple moyen.

| $m_{\text{farine}}$ (kg) | CM1 <sub>moy</sub> | Cm1 <sub>moy</sub> | CM2 <sub>moy</sub> | Cm2 <sub>moy</sub> |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 0                        | 27,05              | 23,9               | 27,05              | 23,9               |
| 1,5                      | 47,1               | 42,8               | 48,7               | 46,1               |
| 2                        | 50,7               | 47,8               | 54,8               | 53,4               |
| 2,5                      | 62,7               | 56,1               | 63,7               | 61,0               |
| 3                        | 65,9               | 60,5               | 66,1               | 65,1               |
| a                        | 13,3               | 12,4               | 13,5               | 14,1               |
| b                        | 26,8               | 23,9               | 27,8               | 24,6               |
| R <sup>2</sup>           | 0,984              | 0,997              | 0,989              | 0,994              |

Tableau 27. Effet de la masse de farine sur les paramètres significatifs extraits de la courbe de couple moyen (temps d'apparition des pics, affaiblissement, raffermissement et stabilité)

| $m_{\text{farine}}$<br>humide<br>(kg) | tM1 <sub>moy</sub><br>(min) | tm1 <sub>moy</sub><br>(min) | tM2 <sub>moy</sub><br>(min) | tRa <sub>moy</sub><br>(min) | St2 <sub>moy</sub><br>(min) | tm2 <sub>moy</sub><br>(min) | Af2 <sub>moy</sub><br>(N.m) | tA2moy<br>(min) |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1,5                                   | 2,40                        | 5,4                         | 18,6                        | 5,9                         | 11,7                        | 23,9                        | 2,6                         | 5,3             |
| 2                                     | 2,42                        | 5,6                         | 22,9                        | 8,7                         | 10,2                        | 22,5                        | 1,4                         | 0,4             |
| 2,5                                   | 2,46                        | 4,4                         | 21,7                        | 4,5                         | 7,2                         | 23,5                        | 2,7                         | 1,8             |
| 3                                     | 2,42                        | 5,3                         | 22,8                        | 13,0                        | 14,6                        | 20,5                        | 1,0                         | 2,3             |
| Moy                                   | <b>2,43</b>                 | <b>5,17</b>                 | <b>21,49</b>                | <i>nd</i>                   | <i>nd</i>                   | <b>22,61</b>                | <i>nd</i>                   | <i>nd</i>       |
| ET                                    | <b>0,02</b>                 | <b>0,51</b>                 | <b>2,01</b>                 | <i>nd</i>                   | <i>nd</i>                   | <b>1,51</b>                 | <i>nd</i>                   | <i>nd</i>       |

## Résultats et Discussions

---

sur les valeurs moyennes). Plus la masse de farine introduite dans le cuve est grande, plus la valeur du  $C_{\min}$  moyen est important. La pente de la droite est égale à  $6,94 \text{ N.m.kg}^{-1}$  avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) égal à 0,98. A vide, la valeur moyenne du  $C_{\min}$  extrait de la courbe de couple moyen obtenu vaut  $22,4 \pm 0,5 \text{ N.m}$ .

L'effet observé sur le couple moyen montre une proportionnalité entre les maxima et minima extraits de la courbe pour chaque masse de farine (tableau 26). Par contre, si le coefficient  $b$  de la droite de régression ( $y = ax + b$ ) correspond (aux erreurs près) au maximum et minimum moyen du pétrissage à vide, la pente de la droite ( $a$ ) est identique ( $13,3$  et  $13,5 \text{ N.m.kg}^{-1}$ ) pour les maxima ( $CM1_{\text{moy}}$  et  $CM2_{\text{moy}}$ ), plus faible ( $12,4 \text{ N.m.kg}^{-1}$ ) pour le premier minimum ( $Cm1_{\text{moy}}$ ) et plus fort ( $14,1 \text{ N.m.kg}^{-1}$ ) pour le  $Cm2_{\text{moy}}$  (couple moyen minimum en fin de pétrissage). Ceci souligne les écarts que peut provoquer le remplissage de la cuve sur la répartition d'eau et/ou la structuration de la pâte, différences certes faibles, mais bien présentes. Il est envisageable qu'une hydratation différente accentue ces différences ou les gomme. Ainsi, pour faciliter l'analyse des courbes de couple, on pourrait envisager de déterminer les conditions de pétrissage qui font apparaître de telles différences. Concernant les autres paramètres extraits de la courbe de couple moyen, les temps d'apparition des maxima et minima sont d'autant plus variables que la durée du pétrissage augmente (tableau 27). Quelle que soit la masse de farine, le premier pic de consistance ( $CM1_{\text{moy}}$ ) apparaît de façon très régulière après environ 2 min et 25 s ( $\pm 1,2$  s), le premier minimum ( $Cm1_{\text{moy}}$ ) apparaît après 5 min et 10 s ( $\pm 30$  s) alors que le second maximum ( $CM2_{\text{moy}}$ ) apparaît après 21 min et 30 s ( $\pm 2$  min). Pour ce dernier, le temps d'apparition du pic ( $tM2_{\text{moy}}$ ) a tendance à augmenter avec la masse de farine utilisée. La durée du raffermissement ( $tRa_{\text{moy}}$ ) entre le premier minimum de courbe et le second maximum montre une augmentation en fonction de la masse ajoutée (sauf pour la masse 2,5 kg de farine). Enfin, le paramètre de stabilité ( $St2_{\text{moy}}$ , intervalle de temps pendant lequel la valeur du couple moyen est supérieur à 95 % de la valeur du  $CM2_{\text{moy}}$ ) a tendance à diminuer lorsque la masse de pâte augmente. Le remplissage de la cuve influence donc les phénomènes dynamiques de raffermissement ou d'affaiblissement en retardant ou accélérant leur apparition.

La comparaison des courbes d'épaisseur ne fait pas apparaître de différences sur les observations faites d'après les courbes de couple moyen.

Par ailleurs, nous n'avons pas décelé de différences entre les essais réalisés avec la pièce plastique et sans pièce plastique pour une masse de farine de 2,5 kg. Cependant, le petit nombre d'essais réalisés oblige à la prudence dans ces conclusions. Une surpression dans la cuve a un effet positif sur l'incorporation de *nuclei* de gaz dans la pâte



(Baker et Mize, 1946 ; Campbell *et al.*, 1998), mais une différence dans la variation de pression au cours du pétrissage (c'est probablement le cas lorsqu'on travaille avec ou sans la pièce plastique) a-t-elle un impact sur les propriétés rhéologiques de la pâte ? L'incorporation de gaz au sein de la pâte diminue la densité de celle-ci, mais plus on incorpore de gaz, plus on apporte d'O<sub>2</sub> aux systèmes enzymatiques endogènes, ce qui n'est peut-être pas sans conséquence sur les réactions d'oxydation, et sur les réarrangements moléculaires provoqués par ces réactions. Il est possible d'envisager de mesurer l'effet de la pression sur la consommation d'O<sub>2</sub> avec le sitoxygraphe puisqu'on peut faire varier celle-ci d'environ 1 bar autour de la pression atmosphérique.

### 4.3 Etude du comportement des farines au cours du pétrissage

Depuis plusieurs années, un projet récurrent au laboratoire de biochimie I.A.A. concerne l'étude du comportement des farines de variétés pures pendant le pétrissage. Ces farines sont différenciées par leur consommation d'oxygène (Celhay, 2000 ; Eyoum, 2002) ainsi que par leur comportement rhéologique (mesure de couple) au bioréacteur (Levavasseur *et al.*, 2006). Dans toutes ces études, un lien est recherché entre les données obtenues avec les mesures directes réalisées pendant le pétrissage et les données biochimiques mesurées soit sur les farines soit sur les pâtes (activités enzymatiques, concentrations des substrats redox), ainsi que sur les données de panification ou de rhéologie empirique obtenues à partir de ces variétés pures. La mise au point du sitoxygraphe a permis, d'une part d'alimenter cette base de données par la comparaison des farines lors du pétrissage au sitoxygraphe et au bioréacteur, et d'autre part, de la compléter parce que nous réalisons cette étude sur des pâtes très proches (du point de vue de l'hydratation et du pétrissage) de celles utilisées pour fabriquer du pain (industriel ou artisanal). Outre les paramètres de consommation d'O<sub>2</sub>, les mesures d'évolution du couple au cours du pétrissage sont disponibles. Le chapitre qui suit comprend deux études variétales volontairement présentées dans un sens anti-chronologique. La première, réalisée sur les farines issues de la mouture industrielle de variétés pures de blé français de l'année 2005, permet la comparaison entre le sitoxygraphe et le bioréacteur du point de vue des consommations d'oxygène, mais aussi de l'impact du pétrissage sur les différents protagonistes (substrats oxydables lipidiques, protéiques). Dans cette partie, le fil conducteur concerne les données issues des farines et des pâtes pétries au sitoxygraphe, les données issues des pâtes pétries au bioréacteur servent de points de comparaison et de complément aux observations faites. La seconde étude variétale, réalisée seulement avec le bioréacteur sur des

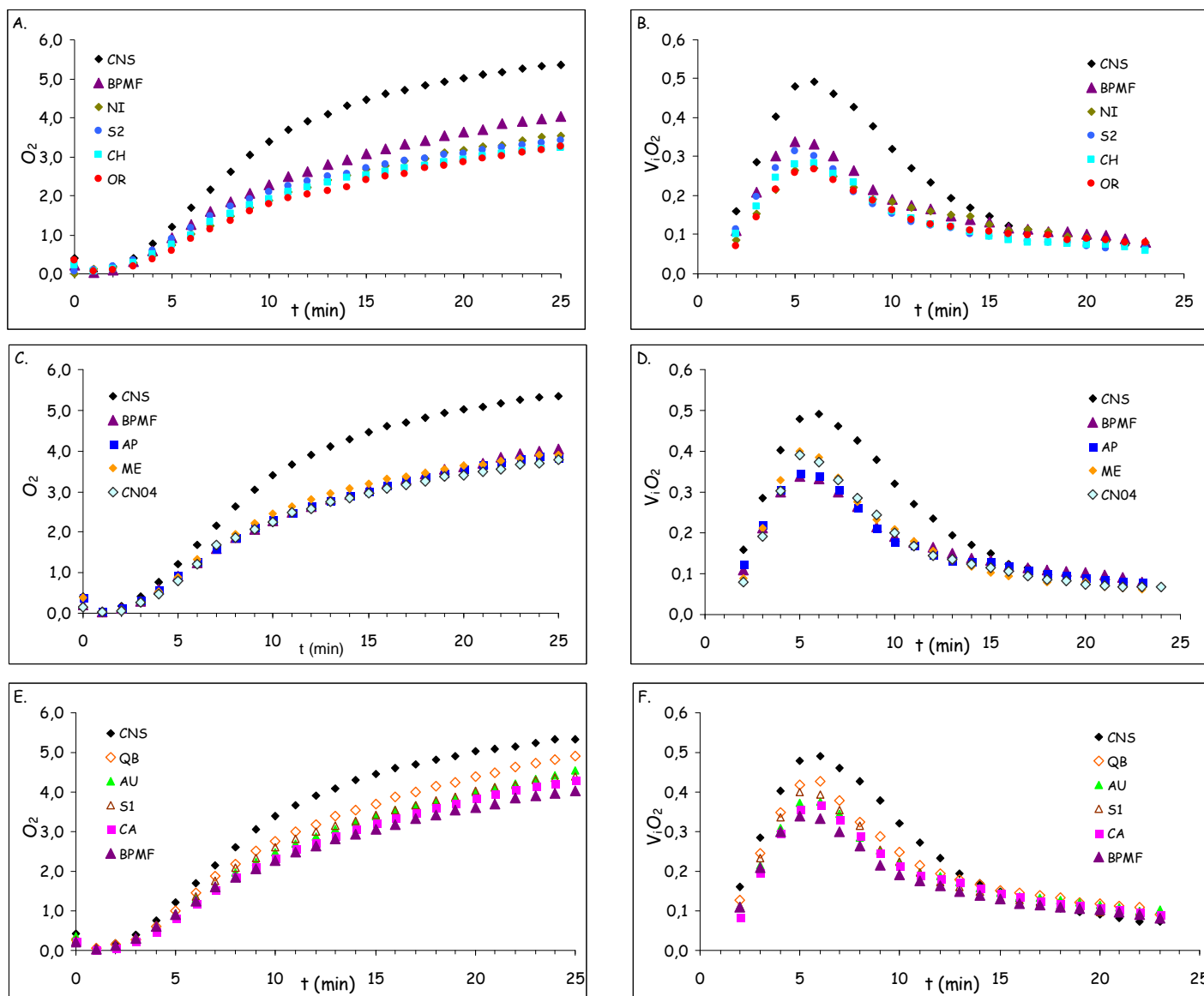


Figure 84. Evolution des consommations d'oxygène (A,C,E) et de leurs vitesses (B,D,F) par des pâtes de farines issues de variétés pures pendant leur pétrissage au sitoxygraphe.

Conditions de pétrissage : 2 min à 30 rpm, puis 23 minutes à 52,5 rpm à 20 °C ; 2,5 kg de farine - 1,5 L d'eau - 45 g de NaCl. La consommation d'O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>) est exprimée en μmol.g<sup>-1</sup> ms et les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) sont exprimées en en μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>.

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPFM : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◇), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◇), NI : Nirvana (◇), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◇), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)

farines de variétés pures de l'année 2003 a fait l'objet d'une publication (Levavasseur *et al.*, 2006) et l'article est présenté sous sa forme publiée.

### 4.3.1 Etude variétale 2005

Cette étude variétale a porté sur un ensemble de 13 farines (3 farines commerciales et 10 farines issues de la mouture industrielle de variétés pures de blé tendre destinées à la panification française). Les caractéristiques de ces farines sont fournies dans le chapitre Matériel & Méthodes.

Dans cette étude, notre travail expérimental a généré une grande quantité de données sur lesquelles une analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Statgraphics<sup>®</sup>. Celle-ci a porté sur la recherche de corrélations entre les données issues du sitoxygraphe ( $O_{2total}$ , vitesses instantanées de consommation d'oxygène,  $V_iO_2$  et paramètres de couple), celles issues du pétrissage de pâte au bioréacteur ( $O_2$ ,  $V_iO_2$  et paramètres de couple), les données enzymatiques (activités enzymatiques extractibles de farines, quantités d'activité perdue dans les pâtes en fin de pétrissage), les données issues du dosage des lipides (cartographie des farines, quantités de PUFA oxydés, teneur en caroténoïdes des farines, quantités de pigments oxydés), les données sur l'état d'agrégation de protéines, les caractéristiques des farines (teneurs en eau, taux de protéines, tests alvéographiques, farinographiques et de panification)...

#### 4.3.1.1 Courbes de consommation et de vitesses instantanées de consommation d'oxygène

D'une manière générale, les courbes de consommation d' $O_2$  sont de type sigmoïde aussi bien dans le cas du sitoxygraphe que dans celui du bioréacteur.

##### 4.3.1.1.1 Obtenues au sitoxygraphe

Les consommations et les vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  des pâtes au cours du pétrissage des farines de variétés pures sont présentées dans la figure 84. Sur chaque graphe, les courbes obtenues à partir des pâtes des farines CNS et BPMF sont systématiquement représentées. Toutes les courbes de consommation d' $O_2$  mesurées avec le sitoxygraphe présentent des similitudes dans leur allure :

✓ une phase de latence durant laquelle aucune consommation d' $O_2$  n'est mesurée (formation de la pâte), puis une accélération de la consommation d' $O_2$  ;



✓ une phase intermédiaire pendant laquelle la consommation d'O<sub>2</sub> après avoir atteint sa vitesse maximale (vers 5-6 min) reste forte mais diminue légèrement. L'intervalle de temps pendant lequel les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> sont importantes varie selon les farines pétries ;

✓ une phase finale dans laquelle les vitesses diminuent de façon quasi-linéaire avec le temps de pétrissage et tendent vers une vitesse de consommation faible uniforme d'environ 0,1 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> (figure 84).

L'examen détaillé de ces courbes fait apparaître différents groupes de farines. Les farines OR, CH, S2 et NI ont les plus faibles consommations d'O<sub>2</sub> (environ 3 μmol.g<sup>-1</sup> ms) après 25 min de pétrissage (figure 84.A.). Ce sont évidemment les farines dont les vitesses instantanées de consommation d'oxygène sont les plus faibles avec une V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> maximale égale à 0,3 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> (figure 84.B.). S2 présente tout de même une vitesse de consommation maximale légèrement supérieure aux autres farines de ce groupe, tandis que NI conserve une vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> plus importante que les autres vers la fin du pétrissage (figure 84.B.).

Un deuxième ensemble de farines regroupe BPMF, AP, ME et CN04. Dans ce groupe, les courbes obtenues pour BPMF et AP sont très proches (figure 84.C.). Les consommations totales d'O<sub>2</sub> après 25 min de pétrissage sont de 3,5 μmol.g<sup>-1</sup> ms et les V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> maximales se situent entre 0,32 et 0,4 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> (figure 84.D.).

Ayant des V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> maximales du même ordre de grandeur (figure 84.F.), les farines QB, AU, S1 et CA constituent un troisième ensemble de farines qui se distingue du précédent par des consommations totales plus importantes allant de 4 à 4,5 μmol.g<sup>-1</sup> ms (figure 84.E.). Ces farines ont des V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> plus importantes que les autres à partir de 10 min, c'est-à-dire dans les phases intermédiaire et finale du pétrissage. Autrement dit, la diminution de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> pour les farines QB, AU, S1 et CA est relativement plus faible. Les farines QB et CNS présentent la particularité d'avoir une V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> maximale autour de 6 min, alors que toutes les autres farines atteignent leur V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> maximale vers 5 min. Enfin, la farine CNS se distingue de toutes les autres farines par une consommation d'O<sub>2</sub> la plus forte en fin de pétrissage (5,3 μmol.g<sup>-1</sup> ms), de même les V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> sont supérieures aux autres farines (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> maximale = 0,5 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>) jusqu'à 15 min de pétrissage environ. La CNS, qui est caractérisée par un temps de plancher optimum (plusieurs semaines), est une farine de qualité supérieure en panification française. Cette farine est celle pour laquelle l'intensité des réactions d'oxydation qui ont lieu au cours du pétrissage est la plus importante. Après 15 min, les V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>, sont devenues très faibles, inférieures à 0,15 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> pour cette farine, et



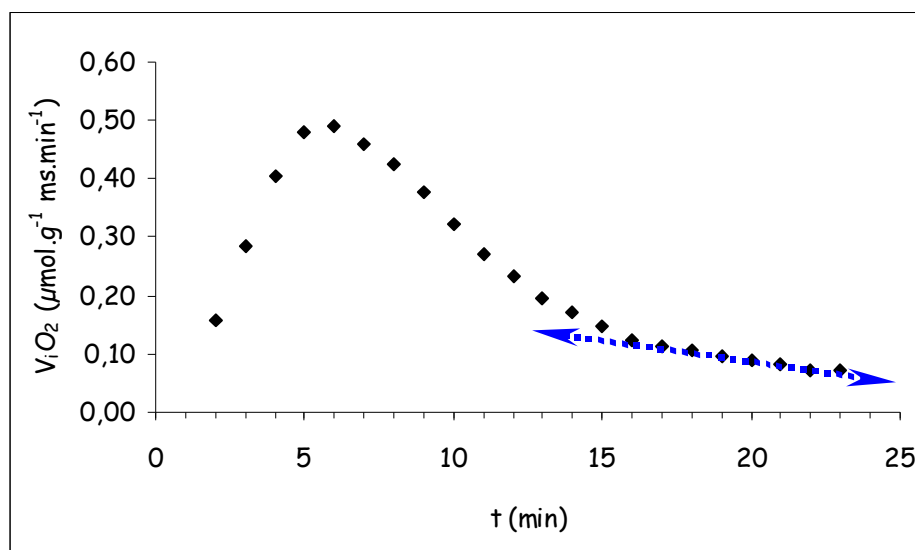


Figure 85. Mise en évidence d'une décélération linéaire de la vitesse à partir de 16 minutes de pétrissage pour la farine CNS

Tableau 28. Correspondance entre le temps d'apparition de la zone linéaire de décroissance de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub>, la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> à laquelle apparaît cette zone et sa décélération pour chaque variété de farine étudiée

| farine  | t* (min) | ViO <sub>2</sub> pour t* (μmol.g <sup>-1</sup> ms.min <sup>-1</sup> ) | Décélération entre t* et 25 min (nmol.g <sup>-1</sup> ms.min <sup>-2</sup> ) |
|---------|----------|---|--|
| CN04    | 12       | 0,14  | -8,56  |
| CNS     | 16       | 0,12  | -7,73  |
| BPMF    | 16       | 0,12  | -4,27  |
| AP      | 12       | 0,15  | -6,15  |
| AU      | 14       | 0,15  | -6,02  |
| CA      | 16       | 0,14  | -6,23  |
| CH      | 16       | 0,09  | -2,84  |
| ME      | 14       | 0,12  | -5,72  |
| NI      | 15       | 0,13  | -5,98  |
| OR      | 14       | 0,11  | -3,47  |
| QB      | 14       | 0,17  | -7,06  |
| S1      | 15       | 0,13  | -5,79  |
| S2      | 14       | 0,10  | -5,10  |
| moyenne | 14,5     | 0,128   | -5,763   |
| ET      | 1,4      | 0,022   | 1,59   |
| CV (%)  | 9,6      | 17,1  | 27,6   |

\* instant t où débute la zone linéaire

de plus, à partir de cette durée de pétrissage, la vitesse diminue proportionnellement au temps (figure 85).

Ce dernier phénomène est observé pour toutes les farines pétries dans cette étude variétale. Pour chaque variété de farine pétrie au sitoxygraphe, le moment d'apparition de cette zone de décroissance linéaire de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> a été déterminé. Les résultats sont présentés dans le tableau 28. Ils montrent que, pour chaque variété, la vitesse diminue de façon proportionnelle au temps à partir de 15 min environ, à l'exception des farines CN04 et AP (t = 12 min). La V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> au début de cette zone est en moyenne de 0,13 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>. Pour les variétés S2 et CH, la V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> est proche de 0,1 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> alors que la variété QB a encore une V<sub>i</sub>O<sub>2</sub> forte (0,17 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>) lors de l'apparition de ce phénomène.

Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre la valeur du V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>MAX et la valeur de la décélération, mais CH et OR, qui ont des vitesses d'oxydation faibles pendant le pétrissage, ont aussi des décélérations faibles en fin de pétrissage (-2,84 et -3,47 nmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-2</sup>, respectivement) alors que S1 a une diminution de vitesse moyenne (-5,79 nmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-2</sup>). A l'opposé CNS, AP, AU, CA et QB, qui font partie des variétés ayant des fortes vitesses instantanées de consommation d'oxygène dans les premières phases de pétrissage, présentent de fortes décélérations de consommation d'O<sub>2</sub>. Pour l'ensemble des variétés, la décélération moyenne est de -5,76 nmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-2</sup> (CV = 27 %). Ces résultats sont cohérents avec l'idée que lorsque les systèmes redox sont très actifs au sein de la pâte, ils diminuent plus rapidement pour atteindre un seuil d'activité relativement uniforme (environ 0,13 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> pour un CV de 17,1 %).

### 4.3.1.1.2 Obtenues au bioréacteur

Outre leur allure générale en forme de sigmoïde, les courbes de consommation d'O<sub>2</sub> obtenues sur le bioréacteur ont en commun (figure 86) :

- ✓ une phase de latence durant laquelle la consommation est nulle ;
- ✓ une phase initiale où la vitesse passe par un maximum vers 5 min ;
- ✓ une phase intermédiaire caractérisée par une vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> qui décroît presque linéairement avec le temps jusqu'à la phase finale au cours de laquelle la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> tend vers une valeur faible (en moyenne égale à 0,03 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>) mais non nulle.

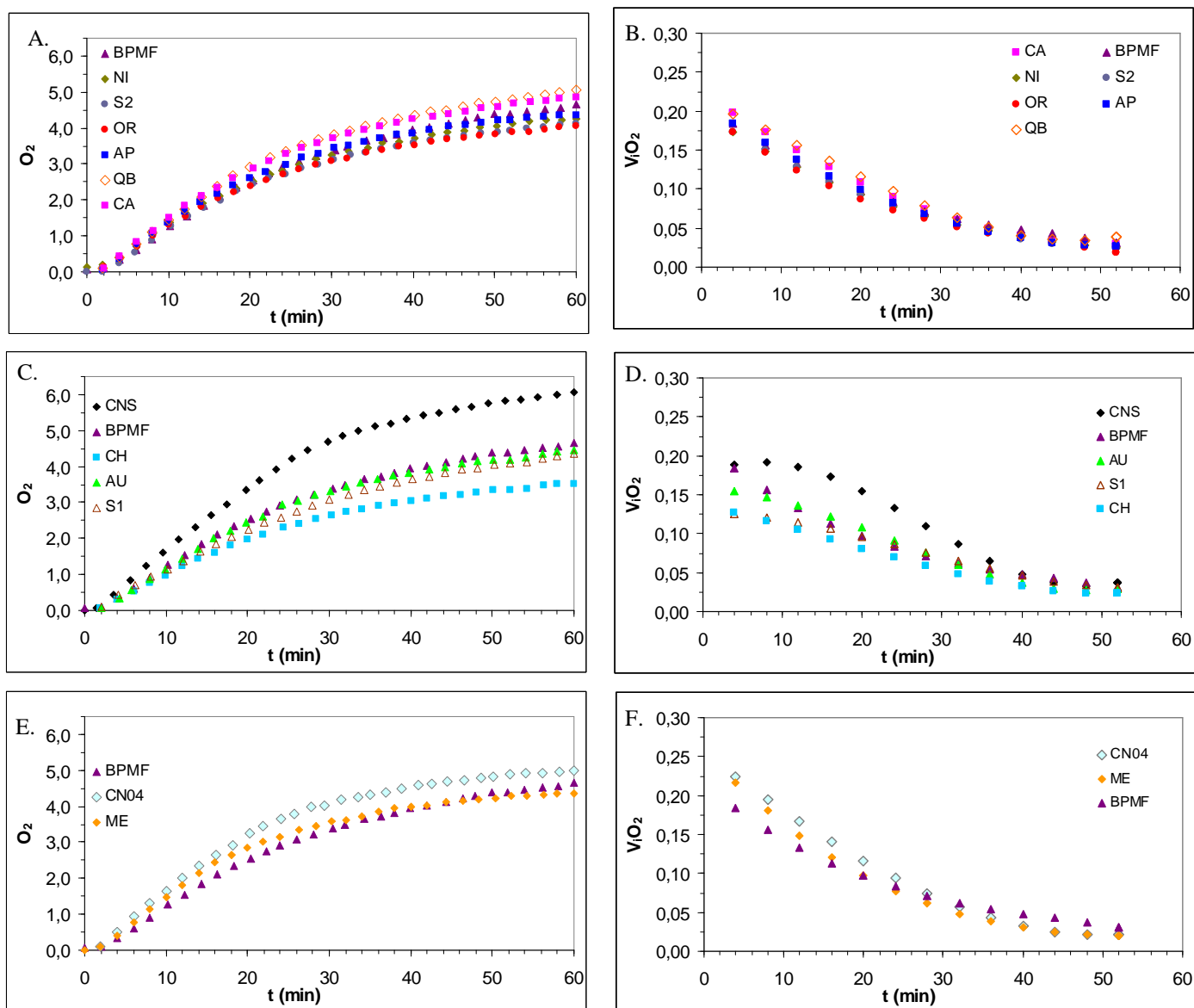


Figure 86. Evolution des consommations d'oxygène (A,C,E) et de leurs vitesses (B,D,F) des pâtes de farine issues de variétés pures pendant leur pétrissage au bioréacteur.

Conditions de pétrissage : 60 min à 200 rpm à 30 °C; 325 g de farine – 227,5 mL d'eau – 6,5 g de NaCl. La consommation d' $O_2$  ( $O_2$ ) est exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$  et les vitesses de consommation d' $O_2$  ( $V_iO_2$ ) sont exprimées en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPMF : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◇), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◆), NI : Nirvana (◆), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◇), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)

Au bioréacteur, la modélisation débute à  $t = 4$  min, ainsi les vitesses instantanées de consommation sont représentées à partir de 4 min et seulement jusqu'à 52 min. De plus, à l'exception de CNS ( $O_{2\text{ total}} = 6,1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) et CH ( $O_{2\text{ total}} = 3 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ), la majorité des pâtes consomment entre 4 et  $5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ . Dans un souci de lisibilité, le critère retenu pour la description des différentes courbes est l'allure des courbes de vitesse de consommation d' $O_2$ . BPMF étant une farine commerciale issue de mélanges de variétés pures, elle est représentée sur chacun des graphiques. Ainsi, on regroupe :

✓ BPMF, NI, S2, OR, AP, QB et CA (figure 86.B.). A partir de 4 min de pétrissages, les vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  de ces pâtes diminuent régulièrement jusqu'à environ 30 min puis la diminution de vitesse est plus lente jusqu'à 60 min de pétrissage.

✓ CNS, BPMF, CH, AU et S1 (figure 86.D.). La caractéristique commune de ces pâtes est la stabilité des vitesses instantanées de consommation d' $O_2$ . En effet, après 4 min, les vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  sont fortes et stables pendant près de 10 min pour CNS, alors qu'elles sont plus faibles ( $V_iO_2 < 0,15 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-1}$ ) et stables sur des temps plus courts (4-5 min) pour les autres variétés.

✓ CN04 et ME (figure 86.F.). Ces farines se distinguent par des vitesses maximales fortes ( $0,22 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-1}$ ), et une diminution de celle-ci plus rapide que dans le cas de la BPMF. De plus, les vitesses finales sont également plus faibles ( $< 0,02 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-1}$ ) que celles des autres farines étudiées.

### 4.3.1.1.3 Comparaison des vitesses instantanées de consommation d' $O_2$ issues du sitoxygraphe et au bioréacteur

#### 4.3.1.1.3.1 Corrélations de Pearson sur les données

En premier lieu, les quantités d' $O_{2\text{TOTAL}}$  consommées en fin de pétrissage sont bien corrélées ( $r = 0,78$ ) pour les deux appareils (tableau 29).

Pour les deux pétrins, les  $O_{2\text{TOTAL}}$  consommées sont bien corrélées avec les vitesses instantanées de consommation initiales et intermédiaires, particulièrement  $O_{2\text{TOTAL B}}$  avec  $V_6O_{2S}$  et  $V_8O_{2S}$  ( $r = 0,82$ ) et  $O_{2\text{TOTAL S}}$  avec  $V_{24}O_{2B}$  ( $r = 0,88$ ).

La comparaison des vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  fournies par les deux appareils montrent que de nombreuses corrélations positives peuvent être déterminées entre les  $V_iO_{2S}$  (issues du sitoxygraphe) et les  $V_iO_{2B}$  (issues du bioréacteur). Globalement, les meilleures corrélations sont trouvées entre les vitesses initiales (entre 2,5 et 8 min pour le

Tableau 29. Corrélations de Pearson entre les vitesses de consommation et l'oxygène consommé mesurés sur les deux pétrins, le sitoxygraphe ( $V_iO_{2S}$  et  $O_{2TOTALS}$ ) et le bioréacteur ( $V_iO_{2B}$  et  $O_{2TOTALB}$ )

|                | $V_{2,5}O_{2S}$ | $V_4O_{2S}$ | $V_6O_{2S}$ | $V_8O_{2S}$ | $V_{10}O_{2S}$ | $V_{12}O_{2S}$ | $V_{14}O_{2S}$ | $V_{16}O_{2S}$ | $V_{18}O_{2S}$ | $V_{20}O_{2S}$ | $V_{22}O_{2S}$ | $O_{2total S}$ |
|----------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| $V_4O_{2B}$    | <b>0,39</b>     | 0,35        | 0,27        | 0,19        | 0,13           | 0,08           | 0,02           | -0,05          | -0,09          | -0,10          | -0,05          | 0,14           |
| $V_8O_{2B}$    | <b>0,59</b>     | <b>0,60</b> | <b>0,56</b> | <b>0,50</b> | <b>0,45</b>    | 0,38           | 0,28           | 0,12           | -0,05          | -0,10          | 0,03           | <b>0,44</b>    |
| $V_{12}O_{2B}$ | <b>0,70</b>     | <b>0,77</b> | <b>0,77</b> | <b>0,74</b> | <b>0,69</b>    | <b>0,62</b>    | <b>0,51</b>    | 0,28           | 0,01           | -0,09          | 0,12           | <b>0,67</b>    |
| $V_{16}O_{2B}$ | <b>0,72</b>     | <b>0,83</b> | <b>0,88</b> | <b>0,86</b> | <b>0,83</b>    | <b>0,77</b>    | <b>0,65</b>    | <b>0,39</b>    | 0,06           | -0,07          | 0,18           | <b>0,80</b>    |
| $V_{20}O_{2B}$ | <b>0,69</b>     | <b>0,83</b> | <b>0,91</b> | <b>0,91</b> | <b>0,89</b>    | <b>0,84</b>    | <b>0,72</b>    | <b>0,45</b>    | 0,09           | -0,05          | 0,22           | <b>0,85</b>    |
| $V_{24}O_{2B}$ | <b>0,65</b>     | <b>0,81</b> | <b>0,90</b> | <b>0,92</b> | <b>0,911</b>   | <b>0,87</b>    | <b>0,77</b>    | <b>0,50</b>    | 0,13           | -0,02          | 0,25           | <b>0,88</b>    |
| $V_{28}O_{2B}$ | <b>0,59</b>     | <b>0,76</b> | <b>0,87</b> | <b>0,91</b> | <b>0,907</b>   | <b>0,88</b>    | <b>0,792</b>   | <b>0,54</b>    | 0,17           | 0,02           | 0,29           | <b>0,87</b>    |
| $V_{32}O_{2B}$ | <b>0,50</b>     | <b>0,67</b> | <b>0,79</b> | <b>0,85</b> | <b>0,87</b>    | <b>0,85</b>    | <b>0,793</b>   | <b>0,57</b>    | 0,24           | 0,09           | 0,34           | <b>0,84</b>    |
| $V_{36}O_{2B}$ | 0,34            | <b>0,50</b> | <b>0,63</b> | <b>0,70</b> | <b>0,74</b>    | <b>0,75</b>    | <b>0,74</b>    | <b>0,59</b>    | 0,32           | 0,19           | <b>0,41</b>    | <b>0,73</b>    |
| $V_{40}O_{2B}$ | 0,13            | 0,25        | 0,36        | <b>0,43</b> | <b>0,48</b>    | <b>0,53</b>    | <b>0,58</b>    | <b>0,55</b>    | <b>0,42</b>    | 0,34           | <b>0,46</b>    | <b>0,52</b>    |
| $V_{44}O_{2B}$ | -0,01           | 0,04        | 0,11        | 0,17        | 0,23           | 0,30           | <b>0,40</b>    | <b>0,49</b>    | <b>0,50</b>    | <b>0,47</b>    | <b>0,51</b>    | 0,31           |
| $V_{48}O_{2B}$ | 0,11            | 0,14        | 0,18        | 0,21        | 0,25           | 0,32           | <b>0,44</b>    | <b>0,57</b>    | <b>0,60</b>    | <b>0,58</b>    | <b>0,61</b>    | 0,38           |
| $O_{2total B}$ | <b>0,65</b>     | <b>0,76</b> | <b>0,82</b> | <b>0,82</b> | <b>0,80</b>    | <b>0,76</b>    | <b>0,67</b>    | <b>0,44</b>    | 0,14           | 0,01           | 0,24           | <b>0,78</b>    |

$V_iO_{2S}$  : vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> mesurée sur le sitoxygraphe à l'instant t

$V_iO_{2B}$  : vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> mesurée sur le bioréacteur à l'instant t

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

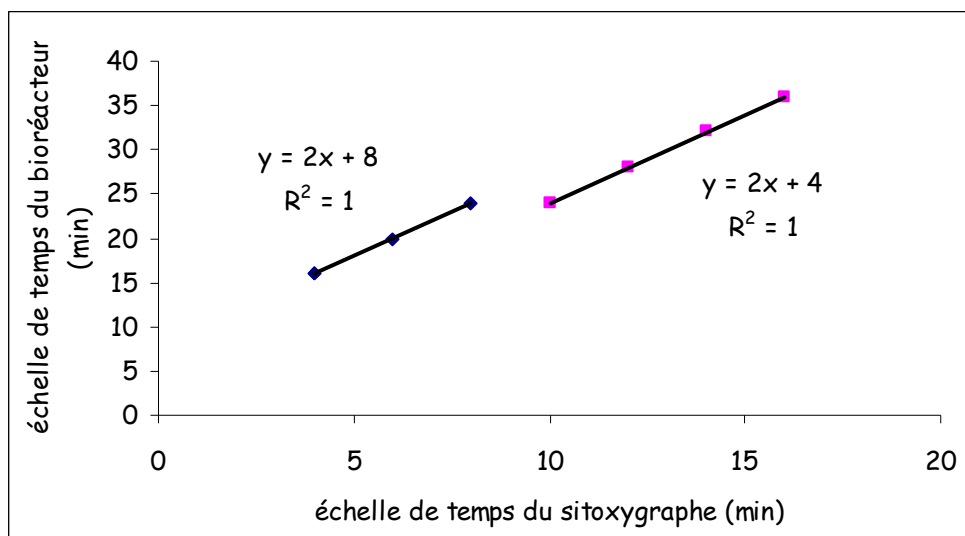


Figure 87. Correspondances des échelles de temps pour les vitesses les mieux corrélées entre les deux pétrins (sitoxygraphe et bioréacteur).

sitoxygraphe et entre 4 et 16 min pour le bioréacteur), intermédiaires (entre 10 et 16 min pour le sitoxygraphe et entre 20 et 36 min pour le bioréacteur) et finales (supérieures à 18 min pour le sitoxygraphe et supérieures à 40 min pour le bioréacteur) des deux pétrins. Ceci correspond à une dilatation de l'échelle de temps entre les deux pétrins, proche de 2,4 quand on passe du sitoxygraphe au bioréacteur.

Si on regarde plus en détail, les rapports de temps entre les vitesses qui corrèlent le mieux entre les deux appareils, il apparaît que ce sont les vitesses des temps intermédiaires qui sont les mieux corrélées (figure 87). Connaissant la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> d'une farine à l'instant t compris entre 10 et 18 min au sitoxygraphe, pour avoir le temps de la vitesse la mieux corrélée au bioréacteur, il suffit de multiplier le temps (de la vitesse de consommation du sitoxygraphe) par deux et d'ajouter 4 min. Pour les vitesses initiales, la proportionnalité est la même (pente = 2) mais la valeur de la constante est deux fois plus grande. Ce résultat indique que les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> mesurées sur les deux appareils sont proportionnelles à condition d'effectuer une correction sur l'échelle des temps. Cette correction dépend de la phase du pétrissage. La valeur de la constante de temps à appliquer varie du simple au double (8 dans la phase initiale et 4 dans la phase intermédiaire). Le sitoxygraphe engendre vraisemblablement d'avantage d'inertie dans la phase initiale de pétrissage.

La majeure partie des réactions d'oxydation enzymatiques se déroule dans la phase initiale de pétrissage ( $V_iO_2$  les plus fortes, correspondant aux plus fortes activités enzymatiques associées aux concentrations en PUFA oxydables les plus élevées). Enfin, les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> en fin de pétrissage (tableau 29) sont moyennement corrélées ( $r = 0,61$  entre  $V_{22}O_{2S}$  et  $V_{48}O_{2B}$ ).

### 4.3.1.1.3.2 Discrimination des farines par analyse en composantes principales

Pour chaque pétrin, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à partir des paramètres oxygène (vitesses instantanées de consommation et oxygène total) de façon à discriminer les farines. Pour chacune des ACP réalisées, les 2 premières composantes principales permettent d'expliquer 83,6 % (figure 88) et 91,0 % (figure 89) de la variabilité des données issues du bioréacteur et du sitoxygraphe respectivement. De plus, la discrimination des farines obtenues sur les données issues du bioréacteur et du sitoxygraphe montre une répartition similaire des différentes farines étudiées, ce que laissent prévoir les résultats dans les paragraphes précédents. Pour les deux pétrins :

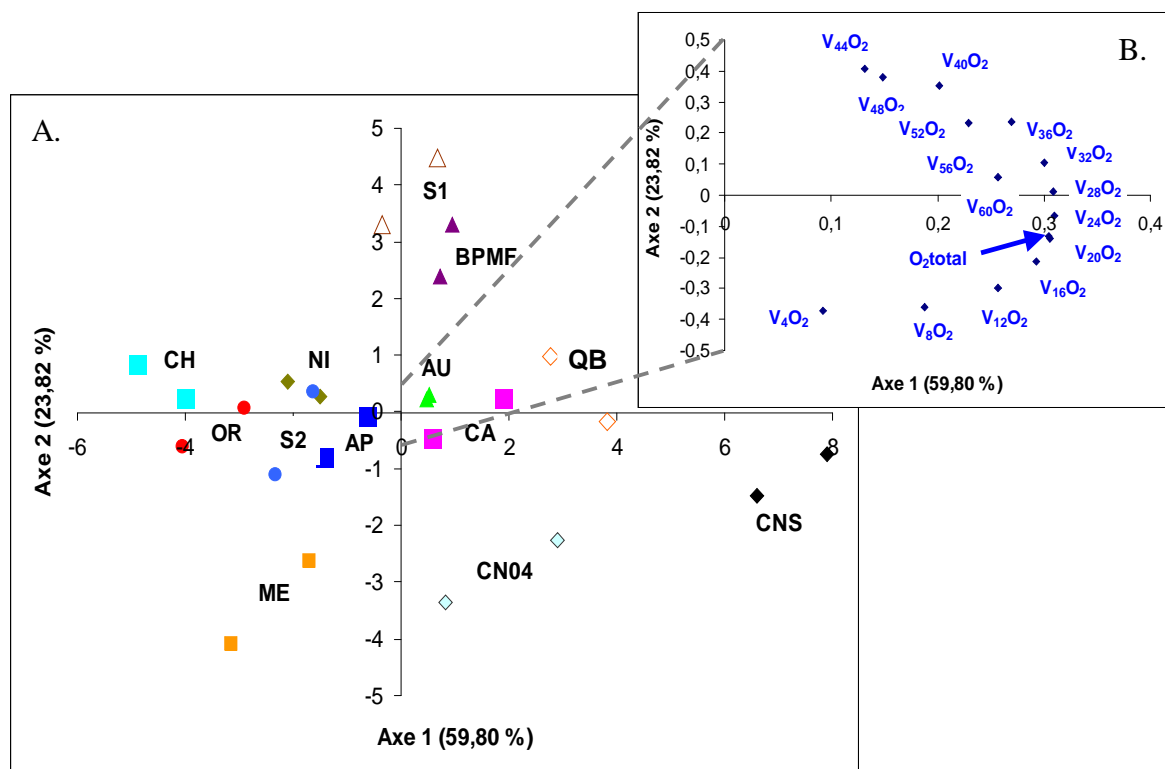


Figure 88. Analyse en composante principale (ACP) sur les données oxygène (consommation totale d'O<sub>2</sub> à la fin du pétrissage et vitesse instantanée de consommation d'oxygène (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>)) issues du Bioréacteur. A. Projection des variétés de farine. B. (encadré) Projection des variables

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPMF : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◇), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◇), NI : Nirvana (◇), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◇), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)

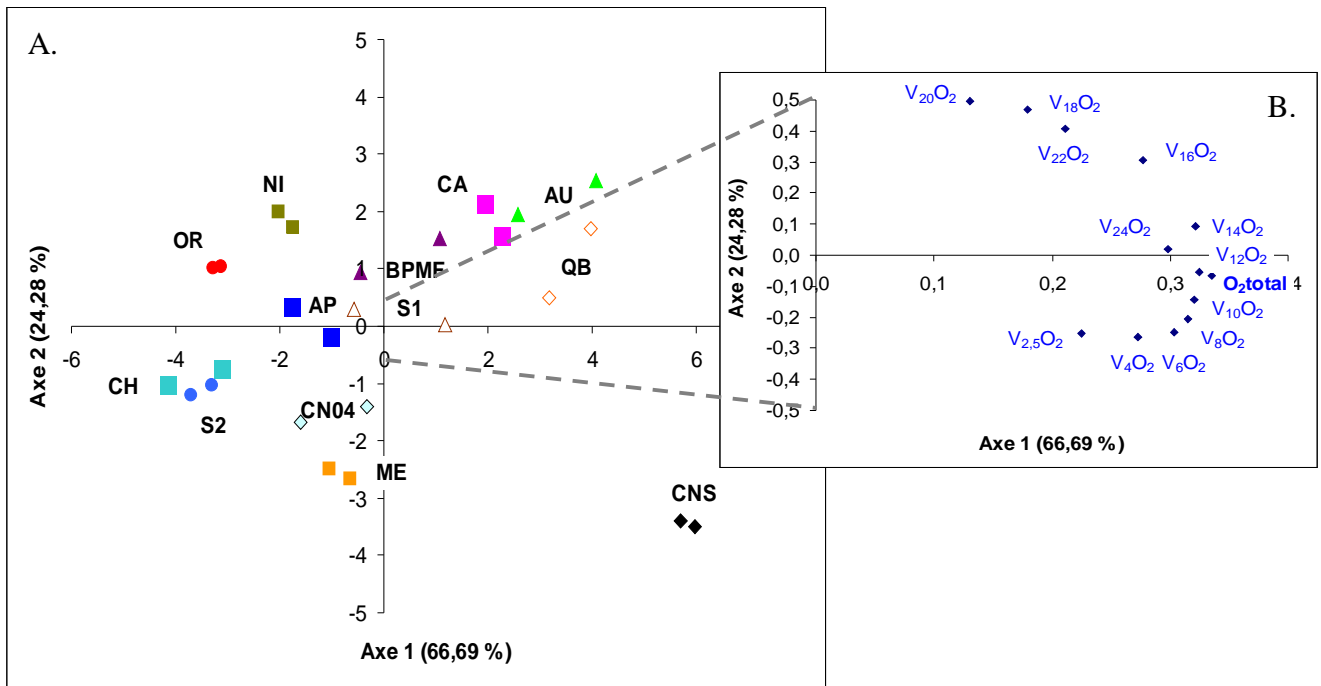


Figure 89. Analyse en composante principale (ACP) sur les données oxygène (consommation totale d'O<sub>2</sub> à la fin du pétrissage et vitesse instantanée de consommation d'oxygène (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>)) issues du Sitoxygraphe. A. Projection des variétés de farine. B. (encadré) Projection des variables

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPMF : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◇), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◇), NI : Nirvana (◆), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◇), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)



**Tableau 30. Vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> maximale et durée (Stab) pendant laquelle la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> reste supérieure à 80 % de la vitesse maximale pour les 13 variétés au bioréacteur et au sitoxygraphe**

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

|         | $V_iO_{2maxBioR}$ | Stab <sub>BioR</sub><br>(min) | $V_iO_{2maxSiTo}$ | Stab <sub>SiTo</sub><br>(min) | $V_iO_{2maxSiTo} / V_iO_{2maxBioR}$ | Stab <sub>BioR</sub> /<br>Stab <sub>SiTo</sub> |
|---------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| CN04    | 0,22              | 10,2                          | 0,39              | 2,6                           | 1,75                                | 3,88   |
| CNS     | 0,19              | 20,2                          | 0,51              | 4,0                           | 2,64                                | 5,00   |
| BPMF    | 0,18              | 9,5                           | 0,35              | 3,2                           | 1,90                                | 2,95   |
| AP      | 0,18              | 10,2                          | 0,36              | 3,0                           | 1,97                                | 3,36   |
| AU      | 0,15              | 15,7                          | 0,39              | 3,1                           | 2,51                                | 5,04   |
| CA      | 0,20              | 10,5                          | 0,38              | 2,9                           | 1,92                                | 3,65   |
| CH      | 0,13              | 13,0                          | 0,29              | 3,3                           | 2,28                                | 3,96   |
| NI      | 0,17              | 10,0                          | 0,41              | 2,9                           | 2,35                                | 3,49   |
| ME      | 0,22              | 8,8                           | 0,27              | 4,4                           | 1,24                                | 2,00   |
| OR      | 0,17              | 9,2                           | 0,28              | 2,8                           | 1,60                                | 3,31   |
| QB      | 0,20              | 12,0                          | 0,43              | 3,2                           | 2,20                                | 3,73   |
| S1      | 0,13              | 18,4                          | 0,41              | 3,0                           | 3,30                                | 6,08   |
| S2      | 0,17              | 10,1                          | 0,31              | 3,3                           | 1,80                                | 3,04   |
| moyenne | 0,18              | 12,1                          | 0,37              | 3,2                           | 2,11                                | 3,81   |
| ET      | 0,03              | 3,7                           | 0,07              | 0,5                           | 0,52                                | 1,05   |
| CV (%)  | 16,6              | 30,4                          | 18,5              | 15,4                          | 24,8                                | 27,7   |

$V_iO_{2max}$  en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$  ; BioR = bioréacteur; SiTo : sitoxygraphe

# CNS et QB ont les vitesses intermédiaires ( $V_{20O_{2B}}$  et  $V_{14O_{2S}}$ ) et consommation totale les plus importantes ;

# CN04 et ME présentent les vitesses initiales les plus importantes ( $V_4O_{2B}$  et  $V_6O_{2S}$ ) ;

# CA, AU, BPF ont les plus fortes vitesses finales ( $V_{40O_{2B}}$  et  $V_{24O_{2S}}$ ) ;

# CH, OR et S2 ont les vitesses intermédiaires ( $V_{20O_{2B}}$  et  $V_{12O_{2S}}$ ) et consommations totales les plus faibles.

Par ailleurs, la comparaison des figure 88.A et 89.A montre que le sitoxygraphe (S) est plus reproductible puisque les points expérimentaux sont très proches pour une même farine.

Le sitoxygraphe permet donc une discrimination des farines, à l'instar du bioréacteur (Eyoum (2002), Manceau (*communication personnelle*), Levavasseur *et al.* (2006), étude variétale 2005,) par la caractérisation directe de l'oxydation ayant lieu au cours du pétrissage.

### 4.3.1.1.3.3 Vitesses maximales et stabilité des vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> obtenues au sitoxygraphe et au bioréacteur

Le tableau 30 présente les vitesses maximales moyennes déterminées pour chaque variété de l'étude ainsi que le critère de stabilité de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub>. Les  $V_{iO_{2MAX}}$  obtenues au bioréacteur sont très homogènes ( $V_{iO_{2moy}} = 0,18 \pm 0,03 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ ), et seules S1 et CH se distinguent des autres variétés avec des valeurs faibles ( $V_{iO_2} = 0,13 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ ). En revanche, la moyenne des vitesses maximales déterminées au sitoxygraphe vaut  $0,37 \pm 0,07 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ , il existe donc un rapport des vitesses maximales moyennes égal à 2,11 entre le sitoxygraphe et le bioréacteur. Par exemple, CNS ( $V_{iO_{2MAX}} = 0,51 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ ) a une  $V_{iO_{2MAX}}$  près de 2 fois plus forte que ME ( $V_{iO_{2MAX}} = 0,27 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ ). La relative homogénéité des résultats du bioréacteur est probablement responsable de l'absence de corrélation entre les vitesses maximales des pâtes pétries au moyen du sitoxygraphe et du bioréacteur (CV < 19 % pour les deux appareils).

Le terme stabilité des  $V_{iO_2}$  est défini comme l'intervalle de temps pendant lequel la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> est au moins égale à 80 % de la valeur de  $V_{iO_{2MAX}}$ . Dans le cas du bioréacteur, cet intervalle est déterminé entre le temps  $t = 2 \text{ min}$  et le temps où la  $V_{iO_2}$  vaut 80 % de la vitesse maximale. Dans le cas du sitoxygraphe, c'est l'intervalle de temps pendant lequel la vitesse est supérieure à 80 % de la  $V_{iO_2}$  maximale.

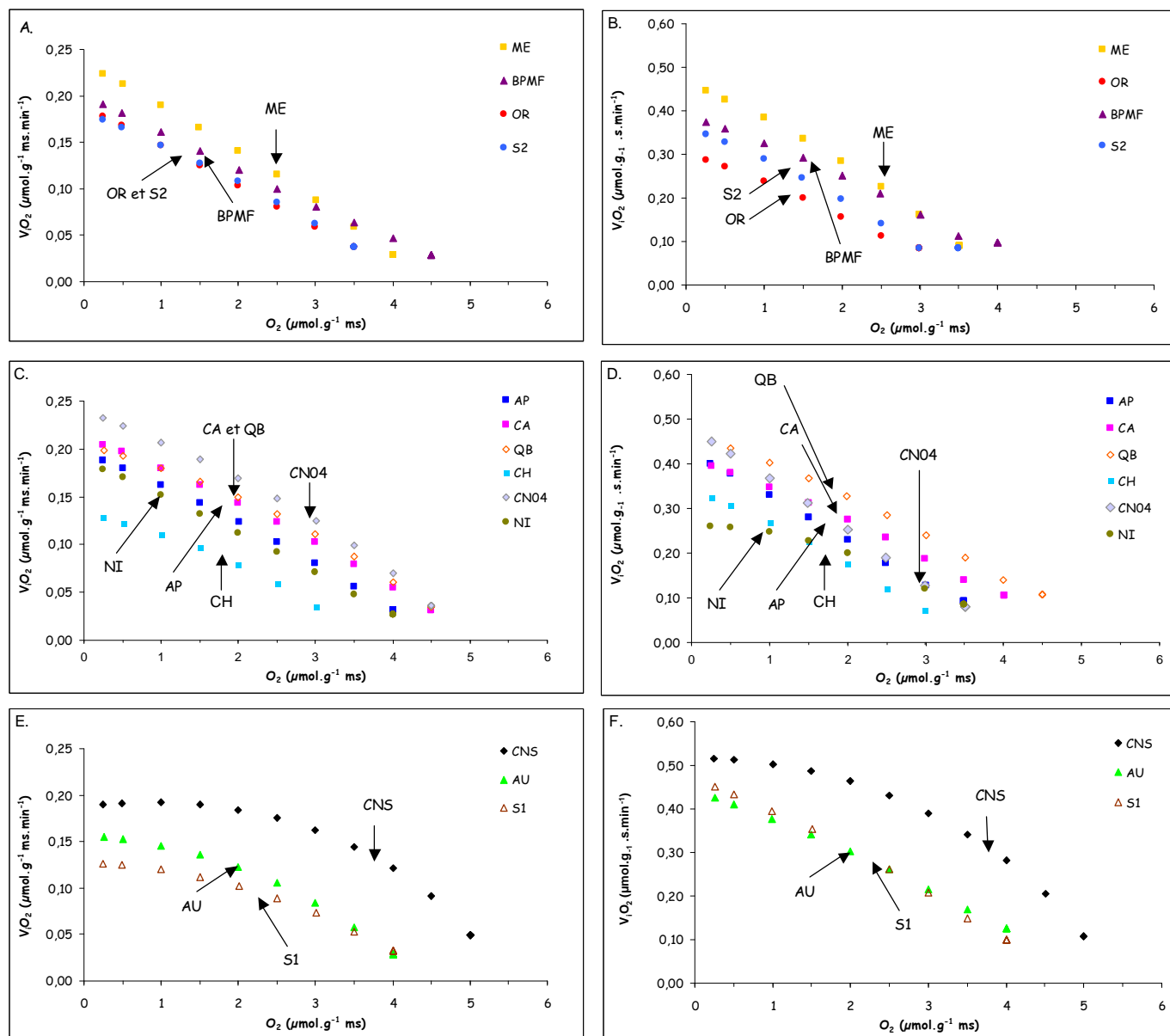


Figure 90. Représentation des vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) en fonction de l'O<sub>2</sub> consommé dans la cuve du bioréacteur (A. - C. - E.) et du sitoxygraphe (B. - D. - F.). les flèches (→) indiquent la teneur en PUFA oxydables des farines (μmol.g<sup>-1</sup> ms)

Conditions de pétrissage : 2 min à 30 rpm, puis 23 minutes à 52,5 rpm à 20 °C ; 2,5 kg de farine - 1,5 L d'eau - 45 g de NaCl. La consommation d'O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>) est exprimée en μmol.g<sup>-1</sup> ms, la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) est exprimée en μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>.

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPFM : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◆), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◆), NI : Nirvana (◆), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◆), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)

A l'inverse des observations faites sur les  $V_{iO_2MAX}$ , la stabilité des  $V_{iO_2BioR}$  est en moyenne 3,8 fois plus importante que celles des  $V_{iO_2SiTo}$  (tableau 30), et la variation inter-variété est plus importante dans le cas du bioréacteur ( $Stab = 12,1 \pm 3,7$  min pour le bioréacteur contre  $3,2 \pm 0,5$  min pour le sitoxygraphe). Il n'existe pas de corrélation entre les stabilités des vitesses instantanées de consommation d' $O_2$ , ceci est principalement dû au comportement différent des pâtes des farines ME (stabilité faible au bioréacteur et grande au sitoxygraphe) et S1 (stabilité grande au bioréacteur et petite au sitoxygraphe). En retirant ces deux variétés de l'analyse, nous déterminons un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,616$  entre les stabilités.

Pour résumer, les cinétiques de consommation d' $O_2$  pour les deux appareils sont différentes : au sitoxygraphe, les vitesses sont importantes, probablement favorisées par une hydratation plus faible, une meilleure homogénéisation du milieu et un apport d' $O_2$  plus efficace. Par ailleurs, la diminution de vitesse de consommation d' $O_2$  intervient rapidement après le passage au  $V_{iO_2MAX}$ . La consommation d' $O_2$  plus importante dans la cuve du sitoxygraphe semble être responsable du ralentissement rapide des systèmes enzymatiques lié à une consommation rapide des substrats réducteurs endogènes à la farine. Ces résultats confirment donc que l'utilisation du bioréacteur permet de ralentir les phénomènes biochimiques qui se produisent pendant le pétrissage, facilitant ainsi l'étude de ces systèmes en dilatant l'échelle de temps par 2,4. Cependant, avec un tel outil, la variabilité autour des vitesses maximales de consommation d' $O_2$  est moins bien appréhendée.

Par ailleurs, l'évolution des vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  au sein de la pâte a été étudiée non plus en fonction du temps mais de l'oxygène consommé. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 90 pour le bioréacteur et pour le sitoxygraphe. Les courbes obtenues sont divisées en 3 groupes. La figure 90.A. montre des pâtes dont la décélération de consommation d' $O_2$  en fonction de l' $O_2$  consommé dans la pâte est linéaire (ME, BPMF, OR et S2). La figure 90.C. montre des pâtes dont la diminution de vitesse en fonction de l' $O_2$  consommé est quasi-linéaire (AP, CA, QB, CH, CN04 et NI). La figure 90.E. illustre des pâtes dont la diminution de vitesse de consommation d' $O_2$  est non-linéaire (CNS, AU, S1). Au sitoxygraphe, les courbes mesurées ont des allures similaires à celles du bioréacteur à l'exception de AU, NI et S1 dont les décélérations de consommation d' $O_2$  sont différentes selon le pétrin utilisé (figure 90.B, D et F).

## Résultats et Discussions

**Tableau 31. Vitesses maximales de consommation d'O<sub>2</sub> (en rouge) et leur diminution (en %, en noir) en fonction de la quantité d'O<sub>2</sub> consommée**

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

|              | Diminutions de vitesse en pourcentage de $V_iO_{2\max}$ en fonction de la quantité d'O <sub>2</sub> consommée |              |              |              |              |              |              |              |              |      |      | O <sub>2</sub> à $0,8*V_iO_{2\max}$ |      |
|--------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|------|-------------------------------------|------|
|              | 0,25  | 0,5          | 1,0          | 1,5          | 2,0          | 2,5          | 3,0          | 3,5          | 4,0          | 4,5  | 5,0  |                                     |      |
| Sitoxygraphe | CN04  | <b>0,39</b>  | 5,9          | 18,1         | 30,5         | 44,0         | 57,7         | 71,7         | 82,2         | nd   | nd   | nd                                  | 1,16 |
|              | CNS   | <b>0,51</b>  | 0,4          | 2,3          | 5,5          | 10,2         | 16,5         | 24,2         | 33,6         | 45,5 | 60,4 | 79,3                                | 2,73 |
|              | BPMF  | <b>0,35</b>  | 3,9          | 12,5         | 21,9         | 32,4         | 44,0         | 56,9         | 69,4         | 74,1 | nd   | nd                                  | 1,40 |
|              | AP  | <b>0,36</b>  | 5,9          | 17,8         | 30,0         | 42,7         | 55,4         | 68,0         | 77,2         | nd   | nd   | nd                                  | 1,08 |
|              | AU  | <b>0,39</b>  | 3,6          | 11,2         | 19,6         | 28,7         | 38,5         | 49,2         | 60,3         | 70,5 | nd   | nd                                  | 1,52 |
|              | CA  | <b>0,38</b>  | 3,7          | 11,6         | 20,5         | 30,1         | 40,7         | 52,5         | 64,7         | 73,2 | nd   | nd                                  | 1,47 |
|              | CH  | <b>0,29</b>  | 5,3          | 17,2         | 30,4         | 45,5         | 63,0         | 77,6         | nd           | nd   | nd   | nd                                  | 1,10 |
|              | ME  | <b>0,41</b>  | 4,6          | 14,2         | 24,9         | 36,4         | 49,3         | 63,8         | 79,9         | nd   | nd   | nd                                  | 1,27 |
|              | NI  | <b>0,27</b>  | 0,7          | 4,9          | 12,3         | 22,8         | 53,9         | 67,5         | nd           | nd   | nd   | nd                                  | 1,86 |
|              | OR  | <b>0,28</b>  | 5,4          | 17,3         | 30,6         | 45,2         | 60,6         | 70,6         | nd           | nd   | nd   | nd                                  | 1,10 |
|              | QB  | <b>0,43</b>  | 3,4          | 10,6         | 18,4         | 26,9         | 36,4         | 46,7         | 57,9         | 69,1 | 75,8 | nd                                  | 1,59 |
|              | S1  | <b>0,41</b>  | 3,8          | 12,1         | 21,3         | 31,2         | 42,0         | 54,0         | 66,8         | 77,7 | nd   | nd                                  | 1,42 |
|              | S2  | <b>0,31</b>  | 5,1          | 16,4         | 28,7         | 42,8         | 59,0         | 75,6         | 75,8         | nd   | nd   | nd                                  | 1,14 |
|              | moy   | <b>0,37</b>  |              |              |              |              |              |              |              |      |      |                                     | 1,45 |
| ET           | <b>0,07</b>   |              |              |              |              |              |              |              |              |      |      | 0,45                                |      |
| CV (%)       | <b>18,5</b>   |              |              |              |              |              |              |              |              |      |      | 31,0                                |      |
| Bioréacteur  | CN04  | <b>0,22</b>  | 3,6          | 10,9         | 18,8         | 27,2         | 36,3         | 46,1         | 57,2         | nd   | nd   | nd                                  | 1,68 |
|              | CNS   | <b>0,17</b>  | -0,9         | -1,4         | -0,2         | 2,7          | 7,6          | 14,4         | 23,5         | 35,8 | 51,9 | 74,2                                | 3,42 |
|              | BPMF  | <b>0,18</b>  | 5,3          | 16,0         | 26,6         | 37,3         | 47,6         | 57,7         | 67,0         | 75,3 | nd   | nd                                  | 1,18 |
|              | AP  | <b>0,18</b>  | 4,5          | 13,9         | 23,8         | 34,2         | 45,3         | 57,1         | 70,1         | nd   | nd   | nd                                  | 1,30 |
|              | AU  | <b>0,15</b>  | 1,6          | 6,2          | 12,7         | 21,2         | 32,0         | 45,4         | 62,9         | 81,4 | nd   | nd                                  | 1,93 |
|              | CA  | <b>0,20</b>  | 3,9          | 12,0         | 20,6         | 29,6         | 39,3         | 49,6         | 61,0         | 73,4 | nd   | nd                                  | 1,46 |
|              | CH  | <b>0,13</b>  | 4,2          | 13,6         | 24,7         | 37,7         | 53,9         | 72,9         | nd           | nd   | nd   | nd                                  | 1,28 |
|              | ME  | <b>0,22</b>  | 5,0          | 15,2         | 25,7         | 36,9         | 48,4         | 60,7         | 73,8         | nd   | nd   | nd                                  | 1,23 |
|              | NI  | <b>0,17</b>  | 5,1          | 15,5         | 26,2         | 37,3         | 48,7         | 60,5         | nd           | nd   | nd   | nd                                  | 1,22 |
|              | OR  | <b>0,17</b>  | 5,9          | 17,9         | 30,0         | 42,3         | 54,6         | 66,7         | nd           | nd   | nd   | nd                                  | 1,08 |
|              | QB  | <b>0,20</b>  | 2,9          | 9,4          | 16,7         | 24,7         | 33,8         | 44,1         | 56,1         | 69,7 | 82,3 | nd                                  | 1,70 |
|              | S1  | <b>0,13</b>  | 1,3          | 5,3          | 11,3         | 19,4         | 29,7         | 42,5         | 58,1         | 74,3 | nd   | nd                                  | 2,22 |
|              | S2  | <b>0,17</b>  | 5,0          | 15,4         | 26,6         | 38,1         | 50,6         | 64,2         | 78,4         | nd   | nd   | nd                                  | 1,20 |
|              | moy   | <b>0,18</b>  |              |              |              |              |              |              |              |      |      |                                     | 1,61 |
| ET           | <b>0,03</b>   |              |              |              |              |              |              |              |              |      |      | 0,64                                |      |
| CV (%)       | <b>16,6</b>   |              |              |              |              |              |              |              |              |      |      | 39,7                                |      |
| r            | nd  | <b>0,501</b> | <b>0,580</b> | <b>0,657</b> | <b>0,730</b> | <b>0,885</b> | <b>0,897</b> | <b>0,855</b> | <b>0,941</b> | nd   |      | <b>0,806</b>                        |      |

- les valeurs en noirs représentent le pourcentage de perte par rapport à  $V_iO_{2\max}$

- les valeurs en rouge, correspondent au  $V_iO_{2\max}$  exprimées en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms.min}^{-1}$

- en gras, le coefficient de Pearson déterminant la corrélation entre les données bioréacteur et sitoxygraphe pour une même quantité d'O<sub>2</sub> consommée.

- O<sub>2</sub> à  $0,8*V_iO_{2\max}$  : quantité d'O<sub>2</sub> consommée quand 80 % de  $V_iO_{2\max}$  est atteinte

Par suite, les décélérations de consommation d'O<sub>2</sub> en fonction des quantités d'O<sub>2</sub> consommées pour chacune de pâte pétrées au bioréacteur et au sitoxygraphe ont été calculées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la vitesse maximale de consommation (tableau 31). Dans l'annexe 1 sont fournies les données de vitesse en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-1}$  et de diminution de vitesse en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-2}$ .

Tout d'abord, en moyenne, lorsque la  $V_i\text{O}_2$  devient inférieure à 80 % de la vitesse maximale ( $V_i\text{O}_{2\text{MAX}}$ ), 0,15  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'O<sub>2</sub> ont été consommées en plus dans le bioréacteur (tableau 31). Par ailleurs, les  $V_i\text{O}_{2\text{MAX}}$  interviennent pour les deux pétrins quand environ 0,25  $\mu\text{moles}$  d'O<sub>2</sub> sont consommées, à l'exception de CNS dont la  $V_i\text{O}_{2\text{MAX}}$  au bioréacteur intervient seulement après 1  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'O<sub>2</sub> consommée. Dans le cas de cette farine, la  $V_i\text{O}_2$  est quasi-constante entre 0,25 et 1  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'O<sub>2</sub> consommée (quel que soit le pétrin utilisé) signe d'une stabilité importante des  $V_i\text{O}_2$  pour cette farine puisqu'on observe des  $V_i\text{O}_2$  inférieures à 80 % de  $V_i\text{O}_{2\text{MAX}}$  seulement après la consommation de 2,5  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'O<sub>2</sub> au sitoxygraphe et 3  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'O<sub>2</sub> au bioréacteur.

Entre 1,5 et 2  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'O<sub>2</sub> sont déjà consommées dans les deux pétrins quand la  $V_i\text{O}_2$  devient inférieure à 80 % de  $V_i\text{O}_{2\text{MAX}}$  pour AU et QB. Pour des quantités d'O<sub>2</sub> consommées identiques, cette observation est valable pour NI seulement au sitoxygraphe, et pour CN04 et S1 seulement au bioréacteur. Pour toutes les autres farines, la  $V_i\text{O}_2$  devient inférieure à 80 % de  $V_i\text{O}_{2\text{MAX}}$  pour des quantités d'O<sub>2</sub> consommées comprises entre 1 et 1,5  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ .

Par ailleurs, les diminutions moyennes de  $V_i\text{O}_2$  pour chaque pétrin sont de  $75,5 \pm 4,2$  % au sitoxygraphe et  $72,4 \pm 7,3$  % au bioréacteur. Cependant, les décélérations au maximum de consommation d'O<sub>2</sub> des variétés pétrées au bioréacteur et au sitoxygraphe ne sont pas corrélées. En revanche, on remarque que la valeur du coefficient de corrélation ( $r$ ) augmente quand on compare les diminutions de vitesses de deux appareils respectifs pour des quantités d'O<sub>2</sub> consommées croissantes. Au-delà de la quantité d'O<sub>2</sub> à laquelle les vitesses instantanées de consommation sont stables, plus la quantité d'O<sub>2</sub> consommée est grande, plus les diminutions de vitesses instantanées de consommation sont similaires d'un appareil à l'autre.

Dans les deux pétrins, la quantité de substrats oxydables est identique pour une même farine en tout début de pétrissage. Une fois la pâte formée (2 min pour le bioréacteur, et 1 min pour le sitoxygraphe), l'apport d'O<sub>2</sub> aux systèmes enzymatiques est supposé constant tout au long du pétrissage (hypothèse) pour chaque pétrin. Ainsi, il est intéressant de constater que



pour plus de la moitié des farines, la diminution de stabilité des  $V_iO_2$  assimilée à une diminution de l'activité enzymatique dans la pâte intervient après une quantité d' $O_2$  consommée identique quel que soit le pétrin. C'est donc la quantité de réaction de consommation d' $O_2$  ayant eu lieu dans la pâte qui influence l'activité enzymatique dans celle-ci. La quantité d' $O_2$  consommée est aussi à mettre en relation avec la diminution de substrats oxydables. Dans le cas du sitoxygraphe, les cinétiques de réaction étant plus rapides, l'incorporation constante d'oxygène est très probablement supérieure à celle du bioréacteur. Au bioréacteur, la vitesse de consommation d' $O_2$  dépend principalement de la quantité initiale en acide gras polyinsaturés (PUFA) oxydables et de l'activité LOX (Eyoun, 2002). Ces résultats devront être confirmés au sitoxygraphe, mais pour une quantité d' $O_2$  consommée équivalente dans les deux appareils, il sera aussi intéressant de connaître les cinétiques de dénaturation de la LOX et de diminution en PUFA oxydables (effet de l'incorporation d' $O_2$ ) surtout au début du pétrissage permettant ensuite de connaître leur impact respectif sur la vitesse de consommation d' $O_2$ .

En résumé, le sitoxygraphe et le bioréacteur font apparaître des différences de comportement des farines de variétés pures. Dans la majorité des cas, les fortes vitesses instantanées de consommation initiale entraînent logiquement de fortes consommations d' $O_2$  totale (CNS, QB), ceci étant modulé par l'intervalle de temps pendant lequel la vitesse de consommation d' $O_2$  reste élevée (grand dans le cas de la CNS), et par la diminution de vitesse de consommation dans les phases intermédiaires et finales de pétrissage (faible pour QB, forte pour CNS). On peut dire que les conditions de pétrissage influencent les vitesses des réactions d'oxydation (influence du bras, hydratation), mais les corrélations entre les vitesses sur les deux appareils et les corrélations entre les  $O_{2TOTAL}$  révèlent que les deux pétrins donnent des résultats similaires.

Un point important concerne le début des courbes de consommation d'oxygène qu'il convient de modéliser de la façon la plus précise possible si l'on veut faire apparaître les effets de limitations notamment celui de l'incorporation d' $O_2$  en début de pétrissage.



## Résultats et Discussions

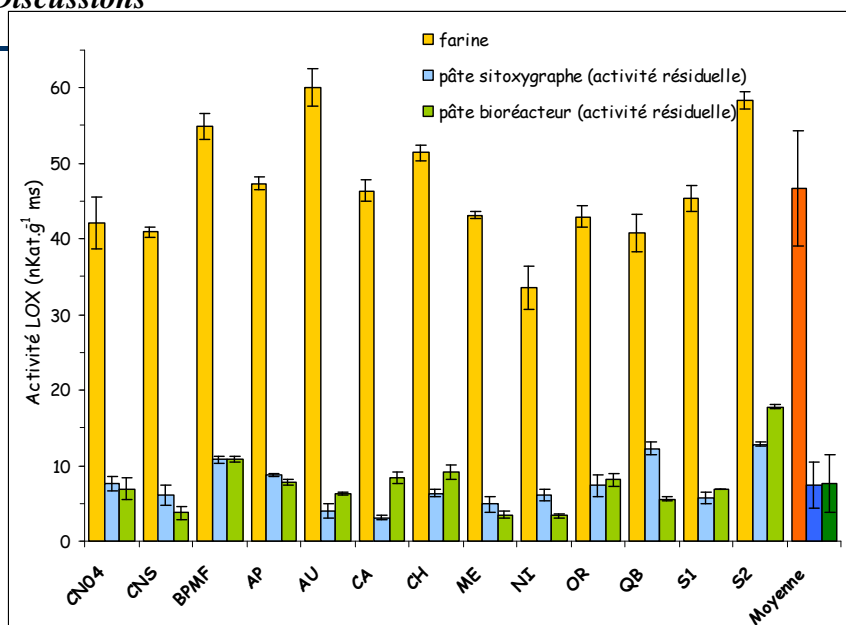


Figure 91. Activité lipoxygénasique extractible à partir des farines et des pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

Tableau 32. Variation de l'activité LOX (nkat.g<sup>-1</sup>.ms) des farines pour les années 1999, 2002, 2003, 2005

| Année                       | 1999 <sup>A</sup> | 2002 <sup>B</sup> | 2003 <sup>B</sup> | 2005 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Nombre de farines étudiées  | 8                 | 7                 | 7                 | 13   |
| Moyenne                     | 58,4              | 56,4              | 54,1              | 47   |
| Ecart type                  | 21,0              | 27,7              | 13,4              | 7,6  |
| Activité LOX la plus forte  | 89,3              | 98,7              | 74,6              | 60   |
| Activité LOX la plus faible | 25                | 20,35             | 34,8              | 33,6 |

A : données fournies par Eyoum *et al* (2003) ; B : données fournies par Levavasseur *et al* (2006)

Tableau 33. Tableau présentant les coefficients de corrélation de Pearson déterminés sur les activités lipoxygénasique des farines et des pâtes issues des deux pétrins.

|                   |   | farine       | pâte sitoxygraphe |             |             | pâte bioréacteur |      |   |
|-------------------|---|--------------|-------------------|-------------|-------------|------------------|------|---|
|                   |   |              | a                 | b           | c           | a                | b    | c |
| pâte sitoxygraphe | a | 0,18         |                   |             |             |                  |      |   |
|                   | b | <b>0,92</b>  | -0,21             |             |             |                  |      |   |
|                   | c | 0,23         | <b>-0,90</b>      | <b>0,59</b> |             |                  |      |   |
| pâte bioréacteur  | a | <b>0,66</b>  | <b>0,57</b>       | <b>0,43</b> | -0,24       |                  |      |   |
|                   | b | <b>0,86</b>  | -0,15             | <b>0,91</b> | <b>0,47</b> | 0,19             |      |   |
|                   | c | <b>-0,48</b> | <b>-0,59</b>      | -0,24       | 0,33        | <b>-0,97</b>     | 0,04 |   |

a : LOX résiduelle ; b : quantité de LOX perdue ; c : Pourcentage de perte  
En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

### 4.3.1.2 Mesures biochimiques

#### 4.3.1.2.1 Mesure des activités enzymatiques extractibles sur farine et sur pâte

Les dosages d'activités enzymatiques de chaque farine et de chaque pâte ont été effectués quatre fois (deux dosages sont effectués sur chacune des deux extractions, respectivement).

##### 4.3.1.2.1.1 Activités LOX

Les activités lipoxygénasiques (moyenne et écart type calculés pour chaque farine et pour chaque pâte issue du sitoxygraphe et du bioréacteur) sont représentées sur les histogrammes de la figure 91. L'activité LOX moyenne extractible sur les farines est de  $47 \pm 7,6$  nkat.g<sup>-1</sup> ms, et les activités résiduelles dosée sur les pâtes pétries au sitoxygraphe et au bioréacteur sont de  $7,4 \pm 3,0$  nkat.g<sup>-1</sup> ms. La diminution moyenne d'activité pour l'ensemble des farines étudiées est de 84 %, ce qui représente une diminution de 24 % de plus que celle décrite par Eyoun *et al.* (2003) après 60 min de pétrissage au bioréacteur et de 14 % de plus que celle décrite par Delcros *et al.* (1998) après 15 min de pétrissage au consistographe<sup>®</sup>. Pour chaque farine, le coefficient de variation moyen est de  $3,65 \pm 2,39$  %, tandis que pour les pâtes sitoxygraphe, le CV moyen est de  $12,0 \pm 7,5$  % et pour les pâtes bioréacteur, le CV moyen est de  $9,5 \pm 6,7$  %. La précision de la mesure de l'activité LOX est très bonne sur les farines (CV < à 5 %), alors que sur les pâtes, la moins bonne précision dans la mesure tient au fait que l'activité résiduelle dans la pâte en fin de pétrissage est faible.

D'après la figure 91 AU ( $60$  nkat.g<sup>-1</sup> ms) et S2 ( $58$  nkat.g<sup>-1</sup> ms) sont les farines qui possèdent la plus grande activité LOX extractible. A l'opposé, NI a la plus faible activité ( $33,6$  nkat.g<sup>-1</sup> ms). La comparaison de l'activité LOX des farines issues des récoltes des années 1999, 2002, 2003 et 2005 montre que, depuis l'année 2003, on se situe dans un rapport de 1 à 2 entre l'activité LOX la plus forte et la plus faible (tableau 32) tandis que ce rapport était de 1 à 4 pour l'année 1999 et de 1 à 5 pour l'année 2002. En 2005, il apparaît que le critère « activité LOX » est moins variable que pour les farines des années précédentes avec une activité moyenne globalement plus faible. A titre comparatif, Leenhardt *et al.* (2006a) rapportent une activité LOX de  $85$  nkat.g<sup>-1</sup> ms pour une farine panifiable composée d'un mélange inconnu de variétés,  $33,6$  nkat.g<sup>-1</sup> ms pour une farine de blé dur et  $12$  nkat.g<sup>-1</sup> ms pour une farine « ancestrale ».

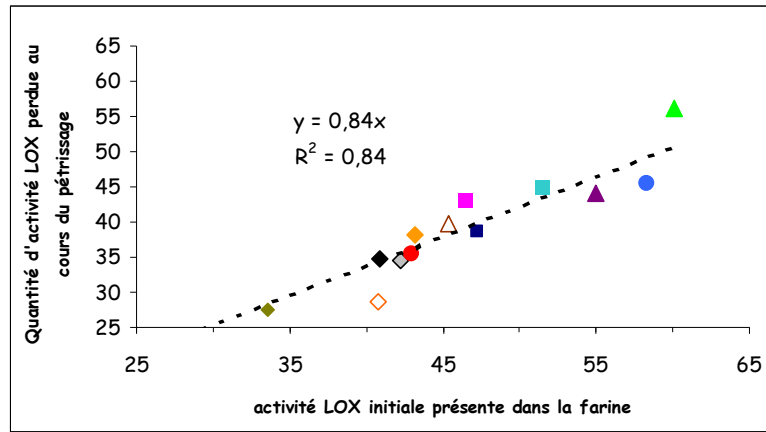


Figure 92. Corrélation entre les activités LOX ( $\text{nkat.g}^{-1} \text{ms}$ ) extractibles des farines et des pâtes en fin de pétrissage au sitoxygraphe

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPMF : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◇), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◆), NI : Nirvana (◆), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◇), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)

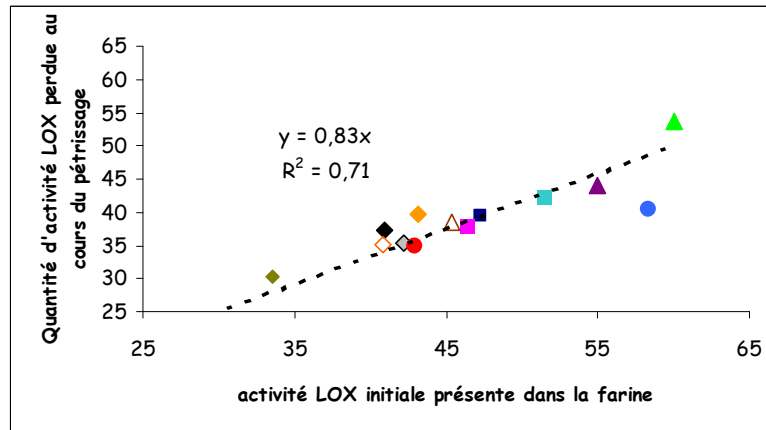


Figure 93. Corrélation entre les activités LOX ( $\text{nkat.g}^{-1} \text{ms}$ ) extractibles des farines et des pâtes en fin de pétrissage au bioréacteur

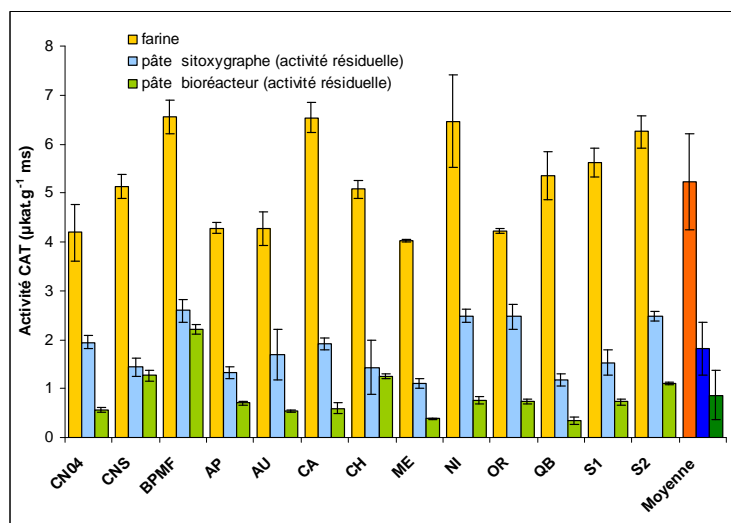


Figure 94. Activités catalasiques extractibles à partir des farines et des pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur

Le tableau 33 donne les valeurs des coefficients de corrélation de Pearson obtenus entre les données LOX, à savoir l'activité initiale extractible dosée dans la farine, l'activité résiduelle dosée dans la pâte, la quantité d'activité perdue pendant le pétrissage et le pourcentage de diminution. Ces résultats montrent que dans le cas du sitoxygraphe, il y a logiquement une forte corrélation entre l'activité initiale et la quantité d'activité perdue ( $r = 0,92$ ). Il existe par ailleurs une corrélation moyenne ( $r = 0,59$ ) entre le pourcentage de diminution d'activité et la quantité perdue. Ainsi, il apparaît que plus la farine possède une activité lipoxygénasique importante, plus la LOX se dénature lors du pétrissage. Ce résultat est confirmé avec les données issues du bioréacteur concernant la corrélation entre l'activité initiale et la quantité d'activité LOX perdue :  $r = 0,86$ , alors qu'aucune corrélation n'est observée entre le pourcentage de diminution et la quantité de LOX perdue. Pour les deux appareils, on observe logiquement une corrélation négative entre l'activité résiduelle et le pourcentage de diminution ( $r = -0,9$  et  $-0,97$  pour le sitoxygraphe et le bioréacteur respectivement). Par ailleurs, une bonne corrélation est observée entre les quantités de LOX perdue au sitoxygraphe et au bioréacteur ( $r = 0,91$ ).

Ainsi, il est possible de déterminer l'activité LOX résiduelle, connaissant l'activité LOX présente dans la farine. Le graphique de la figure 92 représente la corrélation entre l'activité LOX initiale et la perte d'activité LOX mesurée sur les pâtes sitoxygraphe. Pour le sitoxygraphe, nous avons donc la relation (XXXVI) :

$$\text{activité } LOX_{\text{perdue}} = 0,84 \times LOX_{\text{initiale}}$$

Au bioréacteur (figure 93), le coefficient directeur de la droite vaut 0,83. La validité de ces prédictions est évidemment restreinte au domaine d'activités pour lesquelles le modèle a été déterminé ( $33,6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms} < \text{activité LOX initiale} < 60 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ).

Par ailleurs, pour le sitoxygraphe, les quantités de LOX résiduelles ne sont pas corrélées avec l'activité initiale de la farine alors qu'elles le sont pour le bioréacteur (tableau 33).

### 4.3.1.2.1.2 Activités CAT

Les activités catalasiques sont représentées sur la figure 94. L'activité CAT moyenne extractible sur les farines est de  $5,23 \pm 0,98 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ , et l'activité résiduelle dosée sur les pâtes pétries au sitoxygraphe est de  $1,81 \pm 0,54 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ . La perte en activité catalasique est plus importante au bioréacteur puisque l'activité résiduelle moyenne n'est que de  $0,86 \pm 0,50 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ . La perte moyenne d'activité pour l'ensemble des farines étudiées est de 65 % au sitoxygraphe et de 84 % au bioréacteur, analogue aux 70 % de pertes décrits par

Tableau 34. Variation de l'activité CAT ( $\mu\text{kat.g}^{-1}\text{ms}$ ) des farines pour les années 1999, 2002 et 2005

| Année                       | 1999 <sup>A</sup> | 2002 <sup>B</sup> | 2005 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|------|
| Nombre de farines étudiées  | 8                 | 7                 | 13   |
| Moyenne                     | 7,59              | 7,87              | 5,23 |
| Ecart type                  | 1,62              | 1,89              | 0,98 |
| Activité CAT la plus forte  | 10,5              | 11,07             | 6,55 |
| Activité CAT la plus faible | 4,7               | 5,95              | 4,02 |

A : données fournies par Eyoum, *et al* (2003) ; B : données fournies par Manceau (communication personnelle).

Tableau 35. Corrélation de Pearson entre l'activité Catalasique (CAT) des farines, des pâtes et la perte en activité au cours du pétrissage des variétés avec le sitoxygraphe et le bioréacteur

|              |   | farine      | pâte sitoxygraphe |             | pâte bioréacteur |   |
|--------------|---|-------------|-------------------|-------------|------------------|---|
|              |   |             | a                 | b           | a                | b |
| pâte         | a | <b>0,48</b> |                   |             |                  |   |
| sitoxygraphe | b | <b>0,83</b> | -0,08             |             |                  |   |
| pâte         | a | <b>0,46</b> | <b>0,47</b>       | 0,23        |                  |   |
| bioréacteur  | b | <b>0,87</b> | 0,28              | <b>0,81</b> | -0,04            |   |

a : CAT résiduelle ; b : quantité de CAT perdue

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

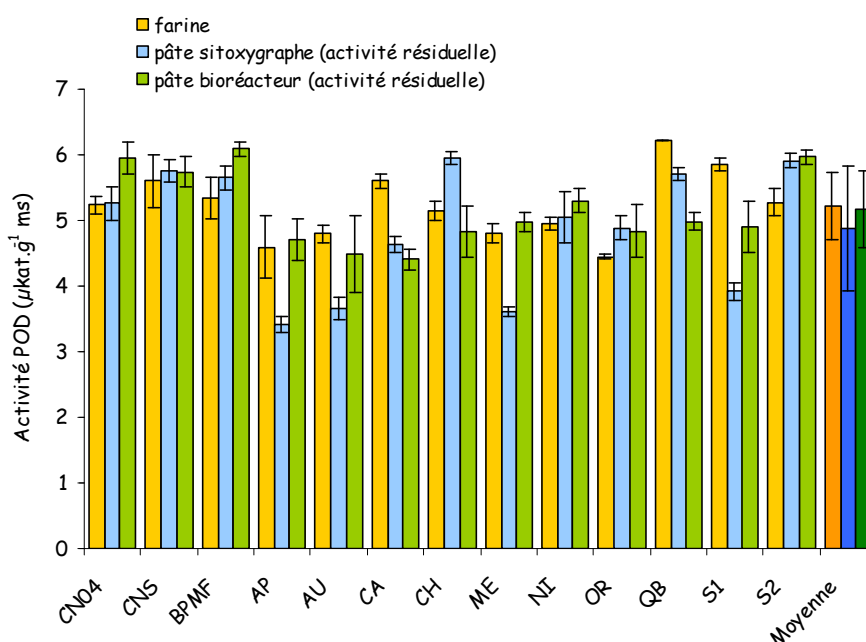


Figure 95. Activités peroxydasiques (POD) extractibles à partir des farines et des pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur

Eyoun (2002) après 60 min de pétrissage au bioréacteur et supérieur aux 30 % décrits par Delcros *et al.* (1998) après 15 min de pétrissage au consistographe®. D'après ces derniers, la CAT est inactivée à pH acide. Par conséquent, le temps d'exposition de l'enzyme à ce pH pendant 60 min au bioréacteur explique la perte d'activité plus importante.

Les variétés peuvent être réparties en trois niveaux d'activités :

- CN04, AP, AU, ME et OR ont une activité CAT proche de  $4 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$  ;
- CNS, CH, QB et S1 ont une activité CAT proche de  $5 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$  ;
- BPMF, CA, NI, S2 ont une activité CAT proche de  $6,5 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ .

Comme pour l'activité LOX, il semble que l'activité CAT soit moins variable en 2005 que dans les années précédentes (tableau 34).

Le tableau 35 présente les corrélations de Pearson entre l'activité CAT mesurée dans les farines et les pâtes ainsi que la perte en CAT au cours du pétrissage. Il y a une faible corrélation positive entre l'activité résiduelle mesurée pour les pâtes sitoxygraphe ( $r = 0,48$ ) et bioréacteur ( $r = 0,46$ ). De façon identique à la LOX, plus on mesure d'activité CAT dans la farine, plus la perte est importante pendant le pétrissage ( $r > 0,83$  entre la perte d'activité et l'activité initiale pour les deux pétrins) ce qui conduit logiquement à une bonne corrélation entre les quantités perdues observées avec les pétrins ( $r = 0,81$ ).

### 4.3.1.2.1.3 Activités POD

Les activités POD sont représentées sur la figure 95. L'activité POD moyenne extractible sur les farines est de  $5,22 \pm 0,51 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ , et les activités résiduelles dosées sur les pâtes pétries au sitoxygraphe ( $4,88 \pm 0,94 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) et au bioréacteur ( $5,17 \pm 0,58 \mu\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sont identiques : l'activité peroxydasique extractible est peu affectée par le pétrissage. De plus, ces résultats montrent encore la très grande homogénéité des farines du point de vue des activités peroxydasiques (le coefficient de variation de l'activité moyenne est inférieur à 10 %).

La perte en activité POD extractible est plus importante au sitoxygraphe puisque les activités résiduelles sont systématiquement inférieures ou égales pour les pâtes pétries au sitoxygraphe (sauf dans les cas de CH et QB dont l'activité résiduelle dans la pâte issue du sitoxygraphe est supérieure à celle dosée sur la farine). La peroxydase est une enzyme connue pour la stabilité de son activité dans les pâtes en comparaison avec la LOX et la CAT. Delcros *et al.* (1998) et Garcia (2000) observent des pertes d'activité POD inférieures à 15 % lors du pétrissage de pâte de farine reconstituée (gluten et amidon) au consistographe®.

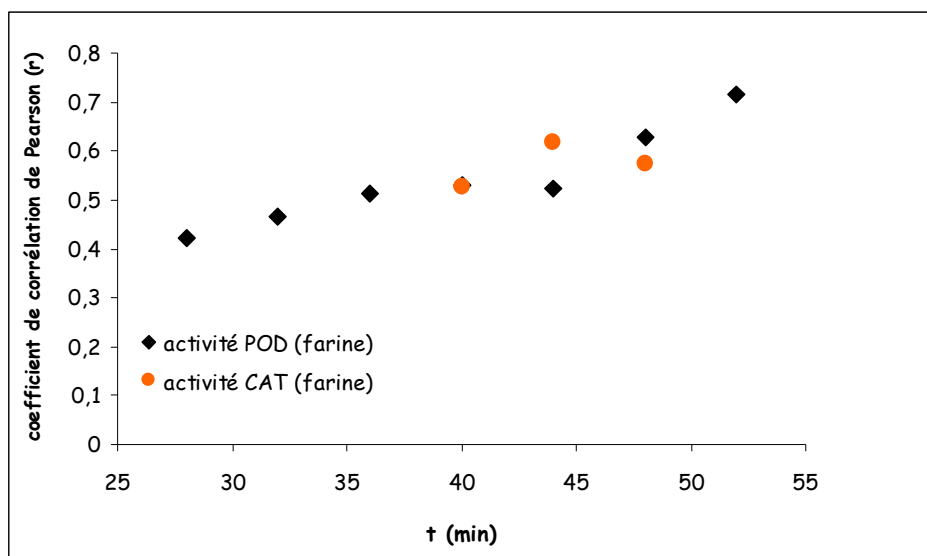


Figure 96. Evolution du coefficient de corrélation de Pearson entre les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (bioréacteur) et les activités ou pertes d'activités de la POD et de la CAT

Rakotozafy *et al.* (1999) ont montré que l'activité POD d'une pâte de farine de blé supplémentée en GOX chute pendant les deux premières min de pétrissage puis se stabilise à 90 % de son activité de départ. Parmi les variétés de farines dont la chute d'activité POD est importante (notamment au sitoxygraphe), AP, AU, CA, ME et S1 ont des pertes comprises entre 17 (CA) et 33 % (S1).

### 4.3.1.2.1.4 Corrélations enzymes-oxygène

Des corrélations ont été recherchées entre les données oxygène (consommation totale et vitesses instantanées de consommation) issues des deux pétrins et les activités enzymatiques. Sur les données fournies par le sitoxygraphe, aucune corrélation n'est trouvée entre les données enzymatiques concernant la LOX et la CAT et les données « oxygène » (tableau de corrélation non montré).

Une faible corrélation positive est trouvée entre les vitesses initiales de consommation d'O<sub>2</sub> (de 2,5 à 8 min) et l'activité POD initiale présente dans la farine ( $r < 0,42$ , résultat non montré). Ceci peut souligner la faible contribution de la POD aux consommations d'O<sub>2</sub>, bien qu'elle puisse catalyser des réactions d'oxydation des acides gras polyinsaturés par son noyau hématinique. Dans ce cas, la participation de la POD aux réactions d'oxydation améliorerait la vitesse d'oxydation en début de pétrissage. Ce dernier résultat illustre que la consommation d'O<sub>2</sub> fait intervenir d'autres systèmes enzymatiques. Cependant, la majeure partie de l'oxydation des acides gras est attribuée à l'activité LOX et il est d'ailleurs surprenant de ne pas observer de corrélation entre l'activité LOX et les vitesses instantanées de consommation.

De façon similaire, les données issues du bioréacteur (O<sub>2 total</sub> et V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) ne sont pas corrélées avec l'activité ou la perte en activité LOX (données non montrées). Ces résultats diffèrent de ceux d'Eyoum *et al.* (2003), peut-être en raison d'une faible variabilité de l'activité LOX en 2005. En revanche, il est possible de trouver des corrélations significatives entre les vitesses instantanées de consommation dans la seconde partie du pétrissage et les dosages d'activité CAT et POD. L'activité POD extractible de la farine est corrélée positivement avec les vitesses instantanées de consommation à partir de 30 min de pétrissage (figure 96) et la corrélation devient forte vers la fin du pétrissage avec  $r = 0,72$  à 52 min. Ces résultats sont différents de ceux du sitoxygraphe. Au bioréacteur, il semble que la POD et la CAT aient un rôle croissant dans les réactions d'oxydation au sein de la pâte après 30 min, prenant peut-être le relais de la LOX pour oxyder le reste des acides gras oxydables quand celle-ci n'a plus qu'une faible action. L'activité CAT est corrélée avec les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> du bioréacteur ( $r = 0,62$  à 44 min, figure 96). Ainsi, en



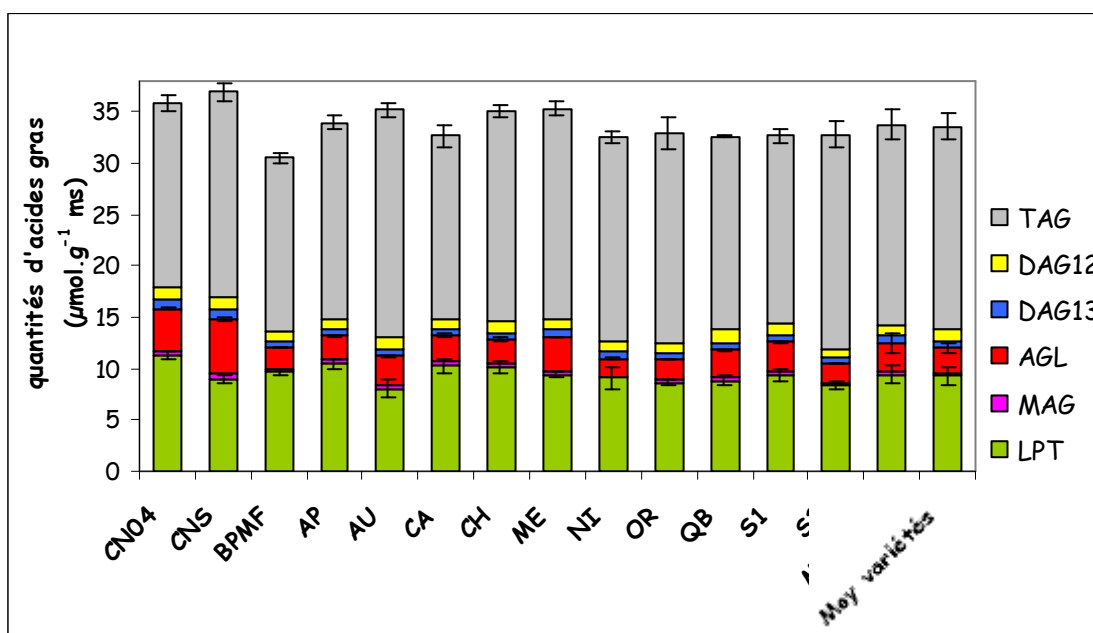


Figure 97. Quantification des différentes fractions de lipides des farines.

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2. Moyenne : moyenne sur l'ensemble des farines ; moyenne variétés : moyenne sans CNS et CN04.

début de pétrissage, quand le système LOX/PUFA est très actif, l'oxydation de PUFA par les composés hématiniques de la CAT et de la POD serait minoritaire, en revanche, à la fin du pétrissage (LOX dénaturée, PUFA oxydables consommés), cette activité oxydante non spécifique des PUFA des fractions AGL et MAG devient non négligeable pour les composés hématiniques (faible activité du système LOX, moindre compétition vis-à-vis de l'O<sub>2</sub>) et l'oxydation de PUFA peut se poursuivre dans la fraction TAG par exemple. Eyoum (2002) avait remarqué que les activités résiduelles CAT et POD des farines étaient fortes quand les pertes en activités LOX des pâtes étaient faibles suggérant un effet protecteur de ces enzymes sur la LOX. Les résultats obtenus soulignent ainsi une participation possible de ces enzymes dans la consommation d'O<sub>2</sub>, mais, ceux-ci ne sont observés que dans le cas du bioréacteur.

### 4.3.1.2.2 Dosage des lipides des farines et des pâtes

#### 4.3.1.2.2.1 Cartographie lipidique

Adapté de la méthode de Tsen et Hlynka (1962), le dosage des lipides est réalisé sur les lipides polaires totaux (LPT) et lipides neutres (LN). Parmi les lipides neutres, nous distinguons différentes fractions de lipides (TAG, DAG<sub>1,3</sub>, DAG<sub>1,2</sub>, MAG, AGL) en les séparant par chromatographie sur couche mince (CCM). Au sein de chaque fraction, les acides gras qui la composent sont quantifiés après séparation et dosage en chromatographie phase gazeuse (CPG) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID).

La cartographie lipidique des farines réalisée dans le cadre de l'étude variétale est présentée dans la figure 97. Les résultats sont exprimés en quantité d'acides gras présents dans les différentes fractions de lipides. La quantité totale moyenne d'acides gras présents dans les farines est de  $33,8 \pm 1,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$  ms, montrant ainsi la faible variation des quantités totales de lipides.

Parmi les farines étudiées, il est important de noter qu'elles sont toutes issues de moutures fraîches (temps de plancher inférieur à 1 semaine) des blés à l'exception des farines CN04 et CNS (qui ont eu un temps de plancher de plusieurs semaines). Etant donné l'incidence du temps de plancher sur l'évolution des lipides, les deux farines à temps de plancher optimal (CN04 et CNS) ont été séparées systématiquement des moutures fraîches. Les deux derniers histogrammes (figure 97) représentent des valeurs moyennes réalisées sur l'ensemble des farines ou sur les variétés pures uniquement.

Les résultats obtenus au sein des différentes classes de lipides soulignent le peu de variabilité dans les fractions majoritaires. La quantité de TAG moyenne est de

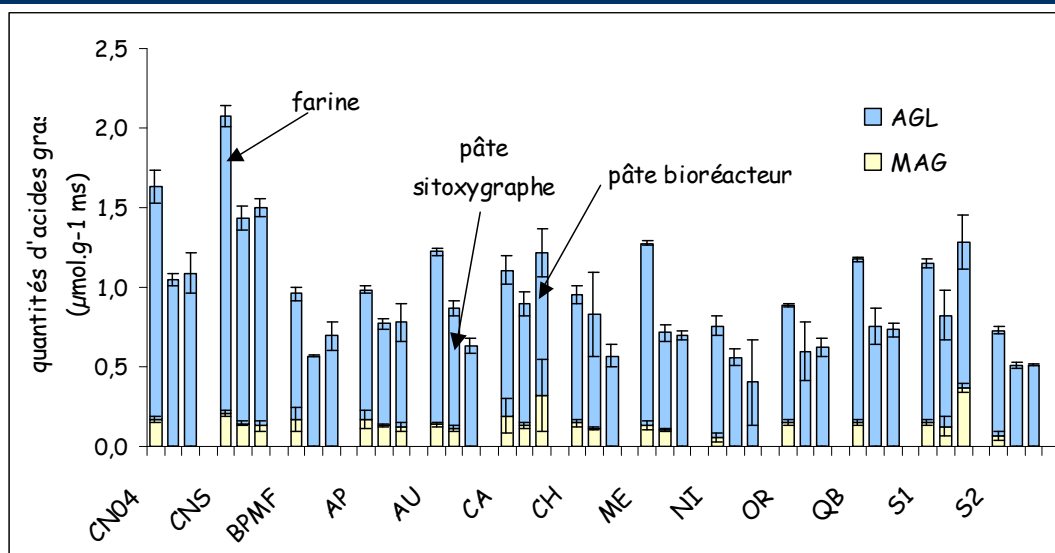


Figure 98. Quantification des acides gras saturés et monoinsaturés (SMUFA) des fractions AGL et MAG des farines et des pâtes (bioréacteur et sitoxygraphe)

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

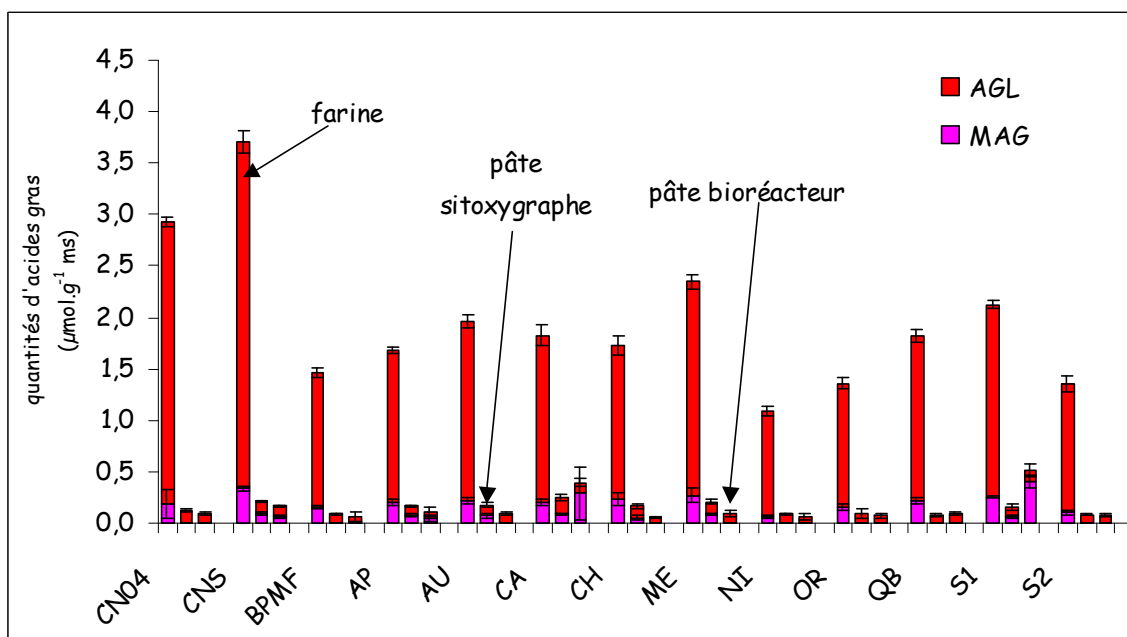


Figure 99. Quantification des acides gras polyinsaturés (PUFA) des fractions AGL et MAG des farines et des pâtes (bioréacteur et sitoxygraphe)

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

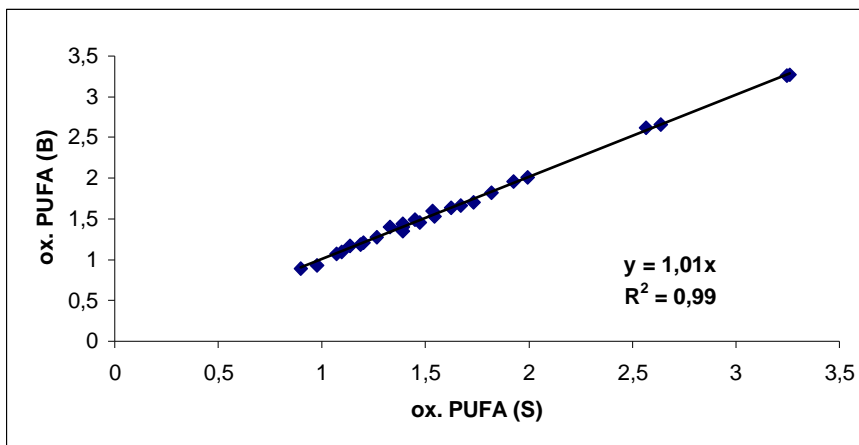
## Résultats et Discussions

$19,82 \pm 1,32 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , la variété BPMF possède la plus faible quantité de TAG ( $16,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) et AU la plus forte ( $22,13 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). De même, les LPT moyens pour l'ensemble des variétés atteignent une valeur de  $9,27 \pm 0,82 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , la variété AU en possède la plus faible quantité ( $8,1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) tandis que CN04 la plus forte ( $11,29 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). Les fractions minoritaires présentent des coefficients de variation plus importants du fait des faibles valeurs dosées, respectivement  $0,33 \pm 0,1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ,  $1,07 \pm 0,19 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  et  $0,65 \pm 0,07 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  pour les fractions MAG, DAG<sub>1,2</sub> et DAG<sub>1,3</sub>. Enfin, la fraction AGL est également très homogène parmi les variétés fraîchement moulues (moyenne de  $2,43 \pm 0,48 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). Dans cette fraction, les quantités d'AGL sont nettement supérieures pour les farines CN04 et CNS, respectivement  $4,21$  et  $5,24 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ . Il est connu que la maturation des farines (ou temps de plancher) entraîne la libération d'acides gras par hydrolyse des fractions de lipides sous l'action des lipases (Castello *et al.*, 1998). La quantité d'AGL pour CN04 et CNS témoigne de leur maturation plus longue (figure 97). Cette observation est confirmée par les quantités de DAG ( $2,15 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ), identiques pour ces deux farines et supérieures à la moyenne des variétés fraîchement moulues ( $1,77 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ).

Afin d'étudier les réactions d'oxydation ayant eu lieu au cours du pétrissage, nous avons exprimé séparément les acides gras polyinsaturés (PUFA) substrats de la LOX et les acides gras saturés et monoinsaturés (SMUFA) non substrats de la LOX contenus dans les fractions AGL et MAG des farines et des pâtes. La teneur en SMUFA (figure 98) diminue au cours du pétrissage quel que soit le pétrin utilisé. La quantité de SMUFA dosée sur les pâtes est identique pour le sitoxygraphe et pour le bioréacteur. Dans la fraction MAG, on observe toujours dans les pâtes des valeurs inférieures à celles des farines, et dans certains cas, la quantité de SMUFA dans les MAG n'est plus détectable par notre système de mesure. La perte moyenne en SMUFA de fractions AGL et MAG dans les pâtes se situe autour de 30 % et semble variable selon les farines (de 10 à 50 %). Ce phénomène de diminution d'extractibilité a déjà été observé par plusieurs auteurs (Eyoun, 2002, Castello, 1999). Dès que la pâte est formée, l'extractibilité des SMUFA diminue de 30 à 35 % en moyenne, puis la quantité de SMUFA extractible est constante tout au long du pétrissage. Pour Castello (1999), cette chute d'extractibilité est due à la formation de complexes d'inclusion entre les SMUFA et les hélices d'amylose.

Concernant les acides gras oxydables (PUFA des fractions AGL et MAG), pour chaque farine, la quasi-totalité des PUFA ont été oxydés après 60 min de pétrissage au bioréacteur et 25 min de pétrissage au sitoxygraphe (figure 99). Dans la plupart des cas, l'oxydation des

**Résultat:**



ox. PUFA : quantité de PUFA oxydés dans la fraction MAG et AGL exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$

**Figure 100. Corrélation entre la quantité d'acides gras poly insaturés oxydés des fractions AGL et MAG dans les pâtes bioréacteur et sitoxygraphe**

**Tableau 36. Corrélation de Pearson entre les teneurs en acides gras polyinsaturés (PUFA) oxydables et oxydés des fractions AGL, MAG et des deux réunies avec les données  $\text{O}_2$  ( $\text{O}_{2\text{TOTAL}}$  et  $\text{V}_i\text{O}_2$ ) issues du sitoxygraphe (En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %)**

|                            | AGL <sub>PUFA</sub> | MAG <sub>PUFA</sub> | Somme des PUFA oxydables | AGL oxydés  | Somme des PUFA oxydés |
|----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|-------------|-----------------------|
| $\text{V}_4\text{O}_2$     | <b>0,75</b>         | <b>0,54</b>         | 0,38                     | <b>0,56</b> | <b>0,76</b>           |
| $\text{V}_6\text{O}_2$     | <b>0,82</b>         | <b>0,62</b>         | <b>0,42</b>              | <b>0,64</b> | <b>0,84</b>           |
| $\text{V}_8\text{O}_2$     | <b>0,83</b>         | <b>0,65</b>         | <b>0,44</b>              | <b>0,67</b> | <b>0,86</b>           |
| $\text{V}_{10}\text{O}_2$  | <b>0,78</b>         | <b>0,64</b>         | <b>0,44</b>              | <b>0,66</b> | <b>0,81</b>           |
| $\text{V}_{12}\text{O}_2$  | <b>0,70</b>         | <b>0,62</b>         | <b>0,43</b>              | <b>0,63</b> | <b>0,75</b>           |
| $\text{V}_{14}\text{O}_2$  | <b>0,60</b>         | <b>0,57</b>         | <b>0,42</b>              | <b>0,57</b> | <b>0,65</b>           |
| $\text{V}_{16}\text{O}_2$  | <b>0,42</b>         | <b>0,49</b>         | <b>0,41</b>              | <b>0,46</b> | <b>0,47</b>           |
| $\text{V}_{18}\text{O}_2$  | 0,09                | 0,29                | 0,34                     | 0,24        | 0,15                  |
| $\text{V}_{20}\text{O}_2$  | -0,26               | 0,04                | 0,20                     | -0,03       | -0,20                 |
| $\text{V}_{22}\text{O}_2$  | -0,37               | -0,08               | 0,12                     | -0,16       | -0,32                 |
| $\text{V}_{24}\text{O}_2$  | -0,14               | 0,06                | 0,20                     | -0,01       | -0,09                 |
| $\text{O}_{2\text{TOTAL}}$ | <b>0,63</b>         | <b>0,57</b>         | <b>0,42</b>              | <b>0,57</b> | <b>0,67</b>           |

**Tableau 37. Corrélation de Pearson entre les teneurs en acides gras polyinsaturés (PUFA) oxydables et oxydés des fractions AGL, MAG et des deux réunies avec les données  $\text{O}_2$  ( $\text{O}_{2\text{TOTAL}}$  et  $\text{V}_i\text{O}_2$ ) issues du bioréacteur (En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %)**

|                            | AGL <sub>PUFA</sub> | MAG <sub>PUFA</sub> | Somme des PUFA oxydables | AGL oxydés  | Somme des PUFA oxydés |
|----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|-------------|-----------------------|
| $\text{V}_4\text{O}_2$     | 0,29                | -0,02               | 0,09                     | -0,07       | 0,27                  |
| $\text{V}_8\text{O}_2$     | <b>0,56</b>         | 0,20                | 0,25                     | 0,14        | <b>0,55</b>           |
| $\text{V}_{12}\text{O}_2$  | <b>0,74</b>         | 0,39                | 0,37                     | 0,33        | <b>0,75</b>           |
| $\text{V}_{16}\text{O}_2$  | <b>0,82</b>         | <b>0,50</b>         | <b>0,45</b>              | <b>0,45</b> | <b>0,84</b>           |
| $\text{V}_{20}\text{O}_2$  | <b>0,84</b>         | <b>0,56</b>         | <b>0,48</b>              | <b>0,50</b> | <b>0,86</b>           |
| $\text{V}_{24}\text{O}_2$  | <b>0,82</b>         | <b>0,59</b>         | <b>0,51</b>              | <b>0,53</b> | <b>0,85</b>           |
| $\text{V}_{28}\text{O}_2$  | <b>0,77</b>         | <b>0,59</b>         | <b>0,52</b>              | <b>0,52</b> | <b>0,80</b>           |
| $\text{V}_{32}\text{O}_2$  | <b>0,67</b>         | <b>0,56</b>         | <b>0,52</b>              | <b>0,47</b> | <b>0,70</b>           |
| $\text{V}_{36}\text{O}_2$  | <b>0,48</b>         | <b>0,45</b>         | <b>0,48</b>              | 0,34        | <b>0,51</b>           |
| $\text{V}_{40}\text{O}_2$  | 0,15                | 0,24                | 0,36                     | 0,11        | 0,18                  |
| $\text{V}_{44}\text{O}_2$  | -0,14               | 0,03                | 0,23                     | -0,11       | -0,12                 |
| $\text{V}_{48}\text{O}_2$  | -0,16               | -0,02               | 0,19                     | -0,14       | -0,14                 |
| $\text{V}_{52}\text{O}_2$  | 0,18                | 0,19                | 0,27                     | 0,12        | 0,21                  |
| $\text{O}_{2\text{TOTAL}}$ | <b>0,75</b>         | <b>0,51</b>         | <b>0,52</b>              | <b>0,40</b> | <b>0,77</b>           |

PUFA dans la fraction MAG ne permet plus de les détecter dans les pâtes. Dans le cas du bioréacteur, deux variétés se distinguent par des quantités de MAG plus importantes dans la pâte que dans la farine, il s'agit de CA et S1. Un résultat analogue a été observé avec les SMUFA des MAG de ces pâtes. Ceci est lié à une erreur dans le dosage (probablement lors du grattage de la tâche MAG mal séparée des LPT. En ne tenant pas compte de ces données erronées, nos résultats indiquent qu'une quantité similaire de substrats ont été oxydés dans les pâtes issues des deux pétrins (perte supérieures à 90 % des PUFA pour toutes les farines pétries avec les deux pétrins). Il y a par ailleurs une très bonne corrélation entre les deux appareils sur les quantités de PUFA oxydés (figure 100). Cependant, on peut raisonnablement envisager des dynamiques de réactions différentes au sein des pâtes pétries par les deux appareils notamment dans les premières min de pétrissage.

Dans la suite, des corrélations obtenues entre les PUFA oxydables, oxydés et les données oxygène issues du sitoxygraphe ( $O_2$  total et  $V_iO_2$ ) et du bioréacteur sont discutées. Les autres corrélations éventuellement obtenues, par une analyse systématique entre les données oxygène et les autres fractions lipidiques sont fournies dans l'annexe 2.

Au sitoxygraphe, les teneurs en PUFA oxydables sont très bien corrélées avec les données de consommation d' $O_2$  dans la première partie du pétrissage (tableau 36). Entre 6 et 10 min, le coefficient de corrélation est supérieur à 0,8 pour les PUFA de la fraction AGL, en revanche, il est à peine supérieur à 0,65 pour ceux de la fraction MAG. Ces résultats confirment le lien fort entre les acides gras oxydables (PUFA des fractions AGL et MAG) et les vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  au début du pétrissage. Dans la littérature, il est rapporté que la LOX de blé oxyde préférentiellement les PUFA des fractions AGL et MAG (Nicolas et Drapron, 1983). C'est bien en début du pétrissage que se produisent la majorité des phénomènes d'oxydation, et dans notre étude, seuls les PUFA déterminent la vitesse de consommation d' $O_2$  jusqu'à 10 min de pétrissage, puisque l'activité LOX et les vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  ne sont pas corrélées. De plus, l'expression des résultats sous la forme d'acides gras oxydables (somme des MAG et AGL) n'améliore pas la corrélation. En revanche de meilleures corrélations sont obtenues entre les  $V_iO_2$  et le total des PUFA oxydés avec des coefficients de corrélation ( $r > 0,8$  entre 6 et 10 min) légèrement meilleure que ceux obtenus entre les  $V_iO_2$  et les PUFA de la fraction AGL. La détermination de la teneur en AGL des farines semble suffisante (dont les 2/3 sont des PUFA oxydables). Ces résultats confirment ceux d'Eyoum *et al.* (2003) et montrent que la mesure des vitesses instantanées de consommation d' $O_2$  permet d'avoir une idée immédiate de la teneur en AGL d'une farine exempte d'additifs (et dans une certaine mesure de son degré de maturation).

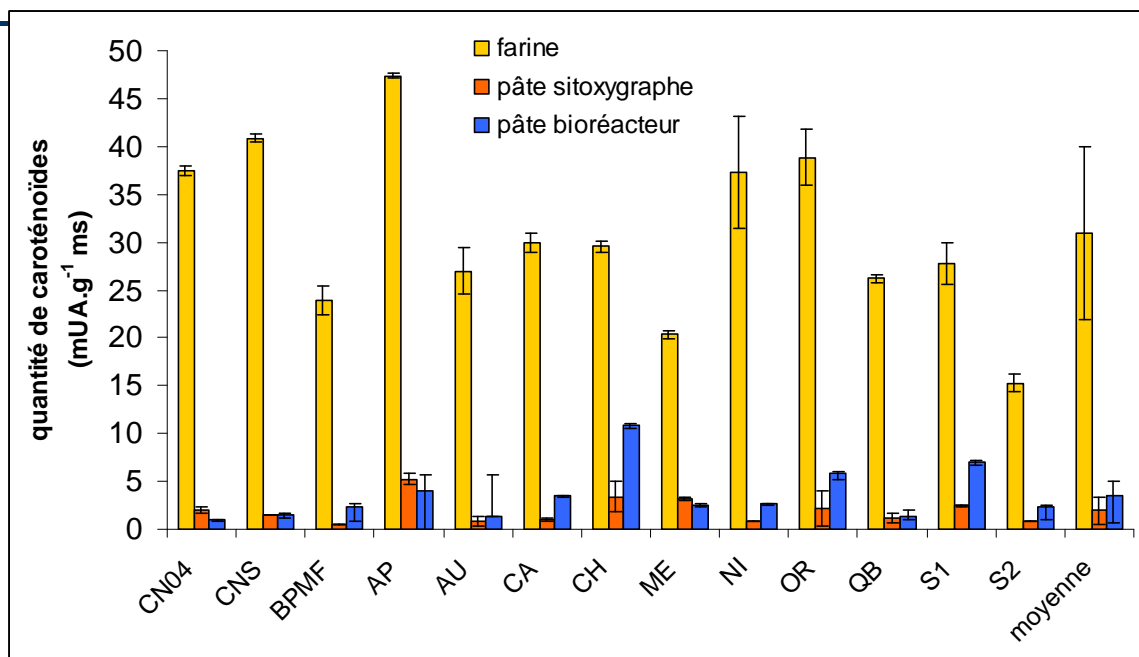


Figure 101. Dosage des caroténoïdes dans les farines et dans les pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

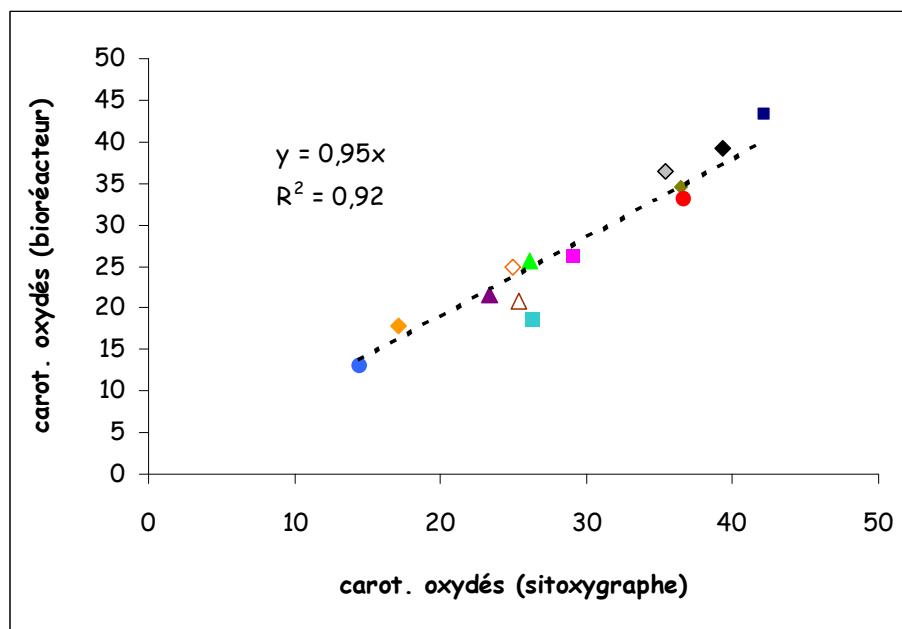


Figure 102. Corrélation entre la quantité de caroténoïdes oxydée au cours du pétrissage - comparaison du sitoxygraphe et du bioréacteur

AP : Apache (■), AU : Aubusson (▲), BPMF : base farine pour la meunerie française (▲), CA : Cap Horn (■), CH : Charger (■), CN04 : Corde Noire 2004 (◆), CNS : Corde Noire Spéciale (◆), ME : Mendel (◆), NI : Nirvana (◆), OR : Orvantis (●), QB : Quebon (◆), S1 : Sankara n°1 (△), S2 : Sankara n°2 (●)

De même, l'acidité grasse des farines reflète de la lipolyse constitue un bon indicateur de leur oxydabilité (au moins au début de la maturation des farines).

Au bioréacteur, les résultats sont similaires (tableau 37). En effet, les meilleures corrélations ( $r > 0,84$ ) sont trouvées entre les vitesses instantanées de consommation intermédiaire (16, 20 et 24 min de pétrissage) d' $O_2$  et la fraction AGL, elles sont inférieures avec la fraction MAG, ce qui est probablement dû aux faibles quantités d'acides gras oxydables présentes dans cette fraction et le remplacement des PUFA oxydables par les PUFA oxydés n'améliore pas les corrélations. Cependant, on note deux différences principales, l' $O_2$  total mesuré au bioréacteur est mieux corrélé avec les acides gras oxydables (tableau 37) que celui mesuré au sitoxygraphe (tableau 36). Dans le cas du sitoxygraphe, les coefficients de corrélations ont des valeurs proches de 0,64, tandis qu'au bioréacteur les valeurs sont proches de 0,75. De plus, au sitoxygraphe, la meilleure corrélation PUFA-vitesse de consommation est à 8 min alors qu'au bioréacteur elle est à 20 min confirmant un rapport de 2,5 entre les deux échelles de temps.

De toute évidence, nos conclusions sont limitées par le fait que les réactions d'oxydation des lipides ont lieu dans les phases initiales et intermédiaires du pétrissage. En effet, dans les pâtes après 25 min de pétrissage au sitoxygraphe et 60 min au bioréacteur, la majeure partie des activités LOX sont perdues et la majeure partie des PUFA sont oxydés. Un développement de ce travail serait de réaliser une étude cinétique des pertes en PUFA et en activité LOX pendant le pétrissage dans les pâtes. Ces mesures permettraient probablement de décomposer le mécanisme de consommation d' $O_2$  par la pâte et comprendre l'influence de chacun des acteurs (enzyme, substrat) sur celle-ci. Pour cela, il conviendrait de travailler sur une période plus courte de pétrissage, entre 0 et 15 min pour le sitoxygraphe par exemple.

### 4.3.1.2.2.2 Dosage des pigments caroténoïdes

Après avoir réalisé un extrait chloroformique des lipides, les pigments caroténoïdes ont été dosés par spectrophotométrie pour les extraits de farine et de pâte issues des deux pétrins. Dans le cas des pâtes, le dosage rend compte de la quantité de caroténoïdes résiduelle dans la pâte. Les résultats montrent une quantité moyenne de pigments caroténoïdes de  $30,9 \pm 9,0$  mAU.g<sup>-1</sup> ms,  $1,94 \pm 1,36$  mAU.g<sup>-1</sup> ms et  $3,56 \pm 2,82$  mAU.g<sup>-1</sup> ms dans les farines, les pâtes sitoxygraphe et les pâtes bioréacteur respectivement (figure 101). La majorité des pigments a disparu en fin de pétrissage. En moyenne, plus de 95 % des pigments sont co-oxydés lors du pétrissage dans le sitoxygraphe et plus de 90 % dans le bioréacteur. La figure 102 indique la corrélation entre la quantité de caroténoïdes oxydés au sein des pâtes pétrées par les deux



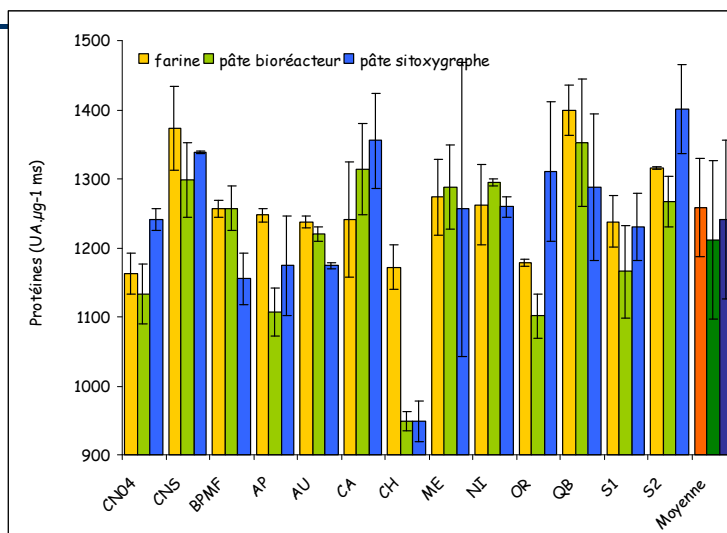


Figure 103. Quantité totale de protéines extraites des farines des variétés pures de blé et des pâtes pétrées au bioréacteur et au sitoxygraphe.

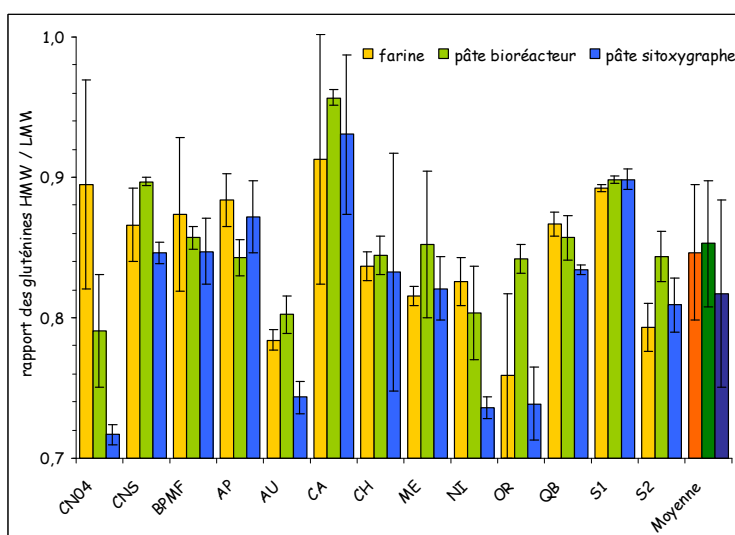


Figure 104. Comparaison de la quantité relative de gluténines de haut poids moléculaires (HMW) par rapport aux gluténines de faibles poids moléculaires (LMW) entre les farines et les pâtes des variétés de blé pétrées au bioréacteur et au sitoxygraphe (rapport F1/F2).

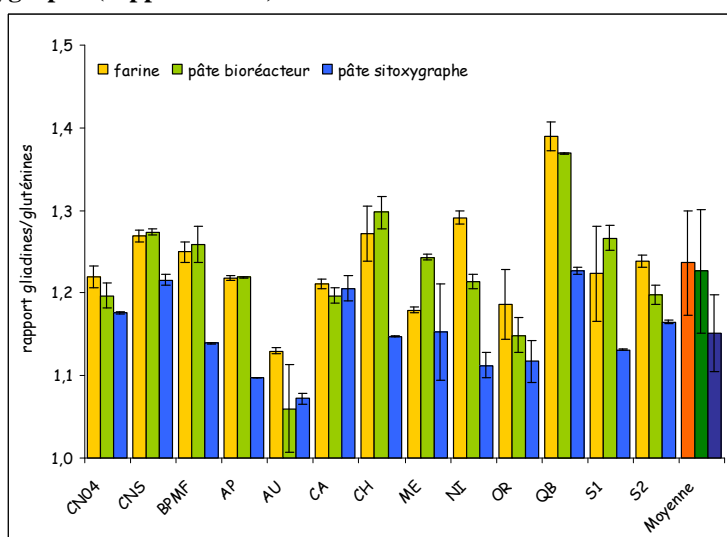


Figure 105. Comparaison de la quantité relative des gliadines (fractions F3 + F4) par rapport aux gluténines totales (F1 + F2) entre les farines et les pâtes des variétés de blé pétrées au bioréacteur et au sitoxygraphe.

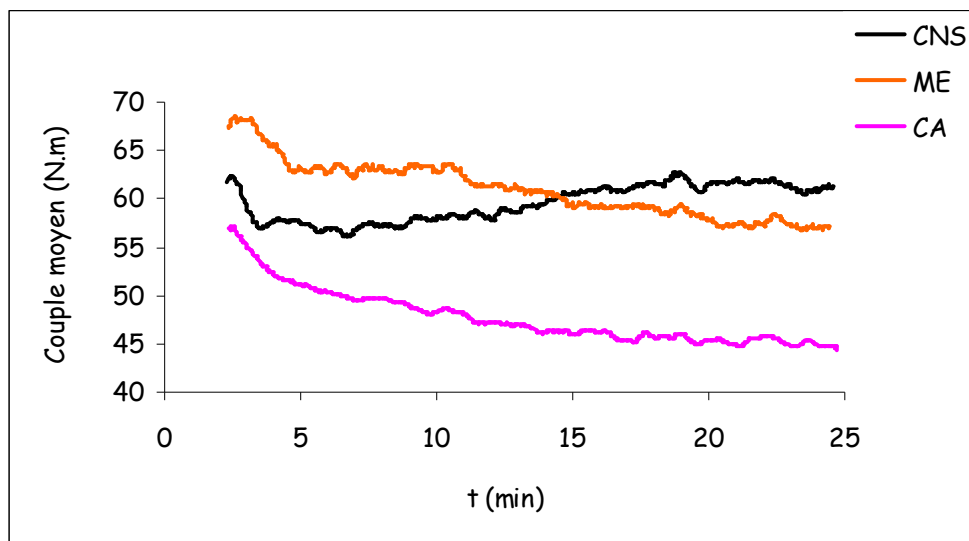
appareils. Les quantités perdues sont effectivement bien corrélées ( $R^2 = 0,92$ ) et la quantité de pigments caroténoïdes oxydés dans la pâte pétrie au sitoxygraphe est légèrement supérieure à celle du bioréacteur.

### 4.3.1.2.3 Mesure de l'état d'agrégation des protéines

En utilisant une adaptation de la méthode de Morel *et al.* (2000b), nous avons réalisé les profils protéiques des farines étudiées ainsi que des pâtes issues des pétrins. Les protéines sont extraites dans un tampon contenant du SDS. Après inactivation des protéases contenues dans l'extrait, un traitement aux ultra-sons permet de solubiliser la plupart des macropolymères protéiques qui demeuraient insolubles au SDS. L'extrait de protéines totales est alors fractionné par filtration sur gel. La détection UV à 214 nm donne le profil protéique pour chaque variété de blé, à la fois sur les farines et sur les pâtes.

Tout d'abord, concernant l'extractibilité des protéines (figure 103), nous avons observé peu de différences entre les quantités moyennes déterminées à partir des farines et des pâtes. Les valeurs moyennes sont de  $1260 \pm 70 \text{ UA} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ ms}$ ,  $1211 \pm 114 \text{ UA} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ ms}$ ,  $1241 \pm 114 \text{ UA} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ ms}$  pour les farines, les pâtes bioréacteur et les pâtes sitoxygraphe respectivement. On note toutefois une diminution de 20 % d'extractibilité après le pétrissage pour la variété CH et cette diminution est identique pour les deux appareils. Ce résultat reste inexpliqué. De plus, au sitoxygraphe, une diminution significative d'extractibilité est mesurée pour les pâtes des variétés BPMF et AU (entre 5 et 10 % par rapport à la farine), alors qu'elle augmente pour les variétés CN04, OR et S2 de 6 à 12 %. Nous avons vérifié que la quantité totale de protéine extraite sur chaque farine étudiée était corrélée ( $r = 0,87$ ) avec le taux de protéines déterminées par dosage Infra rouge (dosage réalisé par les moulins Soufflet), confirmant les résultats de Morel *et al.* (2000b) et de Garcia (*communication personnelle*).

Concernant le rapport gluténines de haut poids moléculaires (HMW, fraction F1) sur gluténines de bas poids moléculaires (LMW, fraction F2) (figure 104), aucune différence n'est observée entre le rapport moyen obtenu sur les farines ( $0,85 \pm 0,048$ ) et sur les pâtes sitoxygraphe ( $0,85 \pm 0,045$ ) et bioréacteur ( $0,82 \pm 0,067$ ). Aucune différence significative n'est observée entre les farines et les pâtes bioréacteur alors que le rapport chute significativement pour les variétés CN04, AU, NI et QB lorsqu'elles sont pétries au sitoxygraphe. Ces différences pourraient être dues à un surpétrissage de ces pâtes au sitoxygraphe (observation confirmée par l'évaluation manuelle des boulangers). Par conséquent, comparé au bioréacteur, le pétrissage plus drastique du sitoxygraphe (25 min) semble entraîner une dépolymérisation des protéines du gluten pour les variétés CN04, AU,



**Figure 106. Exemple des courbes de couple moyen obtenues au sitoxygraphe**  
CA : Cap Horn, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel

NI et QB qui seraient alors surpétrées. Au contraire, CA, réputée pour être une farine « forte », ne l'est pas (pas de modification du rapport F1/F2 par le pétrissage). Darde (2001) assimile le surpétrissage à une baisse importante de la résistance à l'extension de la pâte et de la viscosité, due à la dépolymérisation des sous unités gluténiques lors de la rupture des ponts disulfures.

Par ailleurs, la figure 105 présente les rapports gliadines (fractions F3 + F4) sur gluténines (fractions F1 + F2) pour les farines et les pâtes étudiées. Il est d'usage de conférer les propriétés d'extensibilité aux gliadines, et celles d'élasticité aux gluténines. Le rapport moyen pour l'ensemble des farines dans notre étude est de  $1,24 \pm 0,06$ , variant entre  $1,13 \pm 0,03$  (AU) et  $1,4 \pm 0,017$  (QB). Ce rapport est identique pour les pâtes bioréacteur et supérieur à celui des pâtes sitoxygraphe ( $1,15 \pm 0,046$ ). Les pâtes pétries dans la cuve du sitoxygraphe ont un rapport gliadines sur gluténines égal ou inférieur à celui de la farine. Seules ME et CA conservent une valeur identique (respectivement  $1,15 \pm 0,058$  et  $1,21 \pm 0,015$ ). Pour les autres variétés, la diminution du rapport oscille entre 4 (CN04 et CNS) et 14 % (NI). On a donc, en plus d'un effet variétal marqué sur la valeur du rapport gliadine/gluténines pour les farines, un effet marqué sur la diminution du rapport selon les variétés lorsque la pâte est pétrie au sitoxygraphe. Cet effet est moins visible sur les pâtes issues du bioréacteur, soulignant le caractère peu violent du pétrissage qui ne semble pas engendrer de profond remaniement des structures protéiques dans ce cas.

Aucune corrélation ( $r < 0,5$ ) n'a été observée entre les données « protéines » des pâtes du sitoxygraphe (fraction totale (FT), gluténines (F1+F2), rapport F1/F2, gliadines (F3+F4), rapport gluténines sur gliadines (F1+F2/F3+F4) et fractions  $F_i$  prises séparément) et les données  $O_2$  issues du sitoxygraphe pas plus qu'avec les données « activités enzymatiques » ou les données lipidiques. Le tableau global des corrélations est fourni dans l'annexe 3.

### **4.3.1.3 Paramètres de couple issus du sitoxygraphe**

Pour chaque pâte pétrie au sitoxygraphe, à partir des valeurs brutes de couple mesurées, les courbes de couple moyen et d'épaisseur de couple ont été déterminées comme décrit dans le chapitre « mise au point de la mesure de couple ». Pour chaque pâte (même masse de farine, de chlorure de sodium, d'eau ajoutée et même conditions de pétrissage), après détermination des paramètres de chaque courbe (couple moyen et épaisseur), ceux-ci sont analysés pour identifier les plus pertinents afin de relier un comportement typique lors du pétrissage au sitoxygraphe avec une donnée de caractérisation de la pâte, qu'elle soit

Tableau 38. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen de la première phase de pétrissage au sitoxygraphe (24 observations complètes).

AP : Apache, AU : Aubusson, BPMF : base farine pour la meunerie française, CA : Cap Horn, CH : Charger, CN04 : Corde Noire 2004, CNS : Corde Noire Spéciale, ME : Mendel, NI : Nirvana, OR : Orvantis, QB : Quebon, S1 : Sankara n°1, S2 : Sankara n°2

|                    | CM1 <sub>moy</sub> | Cm1 <sub>moy</sub> | tm1 <sub>moy</sub> | Af1 <sub>moy</sub> | tA1 <sub>moy</sub> |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| CM1 <sub>moy</sub> |                    | <b>0,92</b>        | -0,34              | 0,04               | -0,34              |
| Cm1 <sub>moy</sub> |                    |                    | <b>-0,56</b>       | -0,35              | <b>-0,57</b>       |
| tm1 <sub>moy</sub> |                    |                    |                    | <b>0,62</b>        | <b>1,00</b>        |
| Af1 <sub>moy</sub> |                    |                    |                    |                    | <b>0,62</b>        |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

Tableau 39. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen des deux phases de pétrissage (excepté St2<sub>moy</sub>) au sitoxygraphe (18 observations complètes).

|                    | tm1 <sub>moy</sub> | Af1 <sub>moy</sub> | CM2 <sub>moy</sub> | tM2 <sub>moy</sub> | Raf <sub>moy</sub> | tRa <sub>moy</sub> | Cm2 <sub>moy</sub> | Af2 <sub>moy</sub> |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| CM1 <sub>moy</sub> | <b>-0,60</b>       | <b>0,52</b>        | <b>0,95</b>        | <b>-0,67</b>       | -0,09              | -0,42              | <b>0,83</b>        | <b>0,78</b>        |
| tm1 <sub>moy</sub> |                    | -0,18              | <b>-0,69</b>       | 0,22               | -0,23              | -0,20              | <b>-0,73</b>       | -0,30              |
| Af1 <sub>moy</sub> |                    |                    | 0,42               | -0,09              | 0,35               | -0,01              | <b>0,48</b>        | 0,13               |
| CM2 <sub>moy</sub> |                    |                    |                    | <b>-0,48</b>       | 0,14               | -0,19              | <b>0,93</b>        | <b>0,71</b>        |
| tM2 <sub>moy</sub> |                    |                    |                    |                    | <b>0,71</b>        | <b>0,91</b>        | -0,23              | <b>-0,74</b>       |
| Raf <sub>moy</sub> |                    |                    |                    |                    |                    | <b>0,81</b>        | 0,38               | -0,39              |
| tRa <sub>moy</sub> |                    |                    |                    |                    |                    |                    | 0,07               | <b>-0,62</b>       |
| Cm2 <sub>moy</sub> |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    | 0,40               |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

biochimique, rhéologique ou technologique. Un autre objectif de cette partie est de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les paramètres de couple moyen et d'épaisseur.

### 4.3.1.3.1 Remarques préliminaires

Dans l'ensemble, les allures des courbes de couple sont différentes pour chaque farine, comme l'illustre l'exemple de la figure 106. Par ailleurs, le nombre d'observations complètes lors de chaque analyse est précisé car soit certaines farines n'ont pas pu être soumises à la totalité des tests de caractérisation, soit les paramètres n'existent pas pour certaines farines (par exemple, il n'est pas possible de déterminer de second pic maximum (CM2) pour CA).

Dans notre étude, le paramètre Cm2 s'apparente à la valeur de couple (moyen ou épaisseur) finale. Par conséquent, le paramètre Af2 correspond à la différence entre la valeur de couple au second pic et la valeur finale.

L'ensemble des données est fourni dans l'annexe 4. Pour le couple moyen, les données mesurées sont précises et répétables, avec un coefficient de variation maximum ( $CV_{MAX}$ ) de 7 % pour l'ensemble des farines étudiées, pour les maxima (CM1 et CM2), les minima (Cm1 et Cm2) et le temps d'apparition du premier maximum (tM1). A l'exception de la farine AP, l'affaiblissement dans la première phase (Af1) présente un  $CV_{MAX}$  de 15 %. Les temps d'apparition du premier minimum (tm1) et du second maximum (tM2) montrent un  $CV_{MAX}$  de 26 %. Ce dernier passe à 39 % pour le raffermissement (Raf). Pour tous les autres paramètres, le  $CV_{MAX}$  dépasse 40 % montrant leur faible précision. La précision sur les paramètres d'épaisseur est en général moins bonne que celle obtenue sur les paramètres de couple moyen.

### 4.3.1.3.2 Corrélations entre les paramètres de couple et les autres données

Sur les 32 paramètres définis (16 par courbe de couple), toutes les farines sauf CN04 (soit 24 observations complètes au maximum) possèdent les paramètres 1 à 7 (CM1, tM1, St1, Cm1, tm1, Af1 et tA1). CA, S1 et QB ne font pas apparaître de second pic de couple (constant affaiblissement des valeurs au cours du pétrissage). Ainsi, pour les paramètres CM2, tM2, Raf, tRa, Cfin et Af2, seulement 9 farines (soit 18 observations complètes au maximum) possèdent une valeur pour les paramètres. Il s'agit de CNS, BPMF, AP, AU, CH, ME, NI, OR, S2. Enfin, le paramètre St2 n'existe que pour un faible nombre d'observations complètes (12).

## Résultats et Discussions

Tableau 40. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple définis à partir de la courbe d'épaisseur.

|                    | CM1 <sub>ep</sub> | tM1 <sub>ep</sub> | St1 <sub>ep</sub> | Cm1 <sub>ep</sub> | tm1 <sub>ep</sub> | Af1 <sub>ep</sub> | tA1 <sub>ep</sub> | CM2 <sub>ep</sub> | tM2 <sub>ep</sub> | Raf <sub>ep</sub> | tRa <sub>ep</sub> | Cfin <sub>ep</sub> | Af2 <sub>ep</sub> |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| CM1 <sub>ep</sub>  |                   | <b>0,70</b>       | <b>-0,50</b>      | <b>0,98</b>       | 0,05              | <b>0,90</b>       | -0,06             | <b>0,95</b>       | <b>-0,70</b>      | -0,23             | <b>-0,72</b>      | <b>0,91</b>        | <b>0,86</b>       |
| tM1 <sub>ep</sub>  |                   |                   | -0,16             | <b>0,74</b>       | 0,46              | <b>0,54</b>       | 0,36              | <b>0,62</b>       | -0,44             | -0,43             | <b>-0,59</b>      | <b>0,55</b>        | <b>0,67</b>       |
| St1 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   | -0,47             | <b>0,59</b>       | -0,49             | <b>0,65</b>       | <b>-0,50</b>      | 0,43              | -0,01             | 0,25              | <b>-0,51</b>       | -0,36             |
| Cm1 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   | 0,09              | <b>0,81</b>       | -0,02             | <b>0,93</b>       | <b>-0,72</b>      | -0,33             | <b>-0,76</b>      | <b>0,88</b>        | <b>0,84</b>       |
| tm1 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   | -0,04             | <b>0,99</b>       | -0,04             | 0,19              | -0,36             | -0,13             | -0,05              | 0,06              |
| Af1 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   | -0,11             | <b>0,86</b>       | <b>-0,52</b>      | 0,02              | <b>-0,52</b>      | <b>0,84</b>        | <b>0,79</b>       |
| tA1 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | -0,14             | 0,31              | -0,30             | 0,00              | -0,14              | -0,03             |
| CM2 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | <b>-0,60</b>      | 0,03              | <b>-0,59</b>      | <b>0,97</b>        | <b>0,86</b>       |
| tM2 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | 0,44              | <b>0,95</b>       | <b>-0,51</b>       | <b>-0,62</b>      |
| Raf <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | <b>0,56</b>       | 0,09               | -0,08             |
| tRa <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | <b>-0,50</b>       | <b>-0,65</b>      |
| Cfin <sub>ep</sub> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    | <b>0,72</b>       |
| Af2 <sub>ep</sub>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                   |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

Tableau 41. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple définis à partir de la courbe d'épaisseur et de la courbe de couple moyen.

|                    | CM1 <sub>moy</sub> | tM1 <sub>moy</sub> | St1 <sub>moy</sub> | Cm1 <sub>moy</sub> | tm1 <sub>moy</sub> | Af1 <sub>moy</sub> | tA1 <sub>moy</sub> | CM2 <sub>moy</sub> | tM2 <sub>moy</sub> | Raf <sub>moy</sub> | tRa <sub>moy</sub> | Cfin <sub>moy</sub> | Af2 <sub>moy</sub> |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| CM1 <sub>ep</sub>  | <b>0,88</b>        | 0,02               | 0,06               | <b>0,92</b>        | <b>-0,55</b>       | 0,34               | <b>-0,55</b>       | <b>0,80</b>        | <b>-0,61</b>       | -0,17              | -0,36              | <b>0,67</b>         | <b>0,70</b>        |
| tM1 <sub>ep</sub>  | 0,47               | 0,22               | 0,16               | <b>0,53</b>        | -0,20              | 0,17               | -0,20              | 0,38               | -0,34              | -0,30              | -0,24              | 0,24                | <b>0,52</b>        |
| St1 <sub>ep</sub>  | <b>-0,62</b>       | -0,01              | 0,01               | <b>-0,58</b>       | 0,42               | -0,35              | 0,42               | <b>-0,57</b>       | 0,40               | -0,06              | 0,21               | <b>-0,53</b>        | -0,38              |
| Cm1 <sub>ep</sub>  | <b>0,82</b>        | 0,01               | 0,12               | <b>0,89</b>        | <b>-0,50</b>       | 0,22               | -0,50              | <b>0,73</b>        | <b>-0,67</b>       | -0,27              | -0,44              | <b>0,58</b>         | <b>0,72</b>        |
| tm1 <sub>ep</sub>  | -0,31              | 0,16               | 0,41               | -0,25              | 0,48               | -0,20              | 0,48               | -0,34              | 0,15               | -0,28              | -0,08              | -0,38               | -0,07              |
| Af1 <sub>ep</sub>  | <b>0,89</b>        | 0,08               | -0,08              | <b>0,86</b>        | <b>-0,57</b>       | <b>0,56</b>        | <b>-0,57</b>       | <b>0,84</b>        | -0,38              | 0,10               | -0,12              | <b>0,78</b>         | <b>0,56</b>        |
| tA1 <sub>ep</sub>  | -0,40              | 0,17               | 0,36               | -0,35              | <b>0,52</b>        | -0,21              | <b>0,52</b>        | -0,42              | 0,26               | -0,23              | 0,02               | -0,41               | -0,21              |
| CM2 <sub>ep</sub>  | <b>0,87</b>        | 0,05               | -0,04              | <b>0,92</b>        | <b>-0,60</b>       | 0,31               | <b>-0,60</b>       | <b>0,89</b>        | -0,47              | 0,06               | -0,19              | <b>0,80</b>         | <b>0,65</b>        |
| tM2 <sub>ep</sub>  | <b>-0,68</b>       | 0,37               | -0,05              | <b>-0,78</b>       | <b>0,60</b>        | -0,01              | <b>0,60</b>        | <b>-0,57</b>       | <b>0,83</b>        | 0,44               | <b>0,55</b>        | -0,37               | <b>-0,75</b>       |
| Raf <sub>ep</sub>  | 0,03               | 0,11               | -0,45              | -0,04              | -0,20              | 0,20               | -0,20              | 0,31               | <b>0,63</b>        | <b>0,92</b>        | <b>0,73</b>        | 0,49                | -0,30              |
| tRa <sub>ep</sub>  | <b>-0,59</b>       | 0,32               | -0,18              | <b>-0,71</b>       | 0,46               | 0,05               | 0,45               | -0,46              | <b>0,79</b>        | <b>0,54</b>        | <b>0,58</b>        | -0,25               | <b>-0,74</b>       |
| Cfin <sub>ep</sub> | <b>0,84</b>        | 0,13               | -0,06              | <b>0,86</b>        | <b>-0,50</b>       | 0,37               | <b>-0,51</b>       | <b>0,85</b>        | -0,41              | 0,11               | -0,18              | <b>0,78</b>         | <b>0,57</b>        |
| Af2 <sub>ep</sub>  | <b>0,79</b>        | 0,02               | 0,03               | <b>0,86</b>        | <b>-0,63</b>       | 0,24               | <b>-0,62</b>       | <b>0,80</b>        | -0,47              | -0,03              | -0,18              | <b>0,68</b>         | <b>0,67</b>        |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

### 4.3.1.3.2.1 Sélection des paramètres de couple pertinents

L'ensemble des paramètres a été examiné pour choisir les plus pertinents d'entre eux et éviter les redondances.

Tout d'abord, le temps d'apparition du premier maximum de couple moyen ( $tM1_{moy}$ ) a une valeur moyenne de 2,47 min avec un coefficient de variation faible de 2,9 % pour l'ensemble des farines (Annexe 4). Ce paramètre est éliminé car peu variable d'une farine à l'autre et par conséquent peu intéressant. Par ailleurs, le manque de précision sur la détermination des paramètres  $St1$  que ce soit pour le couple moyen ou l'épaisseur de couple conduit à son élimination.

Ensuite, en raison d'une meilleure répétabilité, les paramètres de couple moyen ont été examinés en premier. Dans la première phase de pétrissage, le premier maximum de couple ( $CM1_{moy}$ ) est conservé (tableau 38), et celui-ci est corrélé avec  $Cm1_{moy}$  ( $r = 0,92$ ), lequel est par conséquent éliminé. De plus,  $tA1_{moy}$  est éliminé car corrélé avec  $tm1_{moy}$  ( $r = 1$ , tableau 38). Le tableau 39 présente les coefficients de corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen (excepté  $St2$ ) soit 18 observations complètes. Arbitrairement, nous avons estimé qu'un coefficient supérieur à 0,75 signifie que les deux paramètres considérés sont redondants, menant au choix de l'un d'entre eux. D'après ce tableau,  $CM2_{moy}$ ,  $Cm2_{moy}$  et  $Af2_{moy}$  sont éliminés car corrélés avec  $CM1_{moy}$ .  $tM2_{moy}$  est éliminé car corrélé avec  $tRamoy$  et ce dernier l'est aussi car il est corrélé avec  $Raf_{moy}$ . Ainsi, à l'issue de cette analyse, seuls les paramètres  $CM1_{moy}$ ,  $tm1_{moy}$ ,  $Af1_{moy}$  et  $Raf_{moy}$  sont conservés pour le couple moyen.

A partir du tableau 40, la même analyse a été menée sur les paramètres d'épaisseur, conduisant à ne conserver que  $CM1_{ep}$ ,  $tm1_{ep}$ ,  $tM2_{ep}$  et  $Raf_{ep}$ . Les corrélations entre les paramètres sélectionnés montrent que  $CM1_{ep}$ ,  $tM2_{ep}$  et  $Raf_{ep}$  sont corrélés avec leurs homologues  $CM1_{moy}$ ,  $tM2_{moy}$  et  $Raf_{moy}$  et sont par conséquent éliminés (tableau 41). Enfin,  $tm1_{ep}$  n'est pas corrélé avec  $tm1_{moy}$  car les valeurs de ces paramètres sont totalement différents pour la variété ME (annexe 4). Par conséquent sur les 32 paramètres définis initialement, seuls 4 ont été retenus :  $CM1_{moy}$ ,  $tm1_{moy}$ ,  $Af1_{moy}$  et  $Raf_{moy}$ . Dans la suite, l'indice « moy » sera sous-entendu pour simplifier l'écriture des paramètres (puisque'ils proviennent tous de la courbe de couple moyen). Pour les trois premiers ( $CM1$ ,  $tm1$ ,  $Af1$ ), 24 observations complètes sont utilisées pour la recherche de corrélation, pour  $Raf$ , seulement 18 observations complètes.



Tableau 42. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents et les données oxygène issues du sitoxygraphe (S).

|                    | V <sub>2,5</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>4</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>6</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>8</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>10</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>12</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>14</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>16</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>18</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>20</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>22</sub><br>O <sub>2S</sub> | V <sub>24</sub><br>O <sub>2S</sub> | O <sub>2total</sub><br>S |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| CM1 <sub>moy</sub> | 0,32                                | 0,36                              | 0,38                              | 0,39                              | 0,38                               | 0,37                               | 0,33                               | 0,22                               | 0,04                               | -0,06                              | -0,02                              | 0,16                               | 0,37                     |
| tm1 <sub>moy</sub> | 0,31                                | 0,25                              | 0,19                              | 0,15                              | 0,15                               | 0,19                               | 0,28                               | <b>0,42</b>                        | <b>0,50</b>                        | <b>0,53</b>                        | <b>0,55</b>                        | 0,27                               | 0,26                     |
| Af1 <sub>moy</sub> | <b>0,52</b>                         | <b>0,51</b>                       | <b>0,48</b>                       | <b>0,46</b>                       | <b>0,46</b>                        | <b>0,49</b>                        | <b>0,55</b>                        | <b>0,61</b>                        | <b>0,54</b>                        | <b>0,49</b>                        | <b>0,57</b>                        | <b>0,46</b>                        | <b>0,57</b>              |
| Raf <sub>moy</sub> | 0,46                                | <b>0,60</b>                       | <b>0,69</b>                       | <b>0,73</b>                       | <b>0,73</b>                        | <b>0,70</b>                        | <b>0,60</b>                        | 0,33                               | -0,07                              | -0,21                              | 0,13                               | <b>0,77</b>                        | <b>0,67</b>              |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

Tableau 43. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents avec les données oxygène issues du bioréacteur (B).

|                    | V <sub>4</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>8</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>12</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>16</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>20</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>24</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>28</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>32</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>36</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>40</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>44</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>48</sub> O <sub>2b</sub> | V <sub>52</sub> O <sub>2b</sub> | O <sub>2TOTALb</sub> |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| CM1 <sub>moy</sub> | <b>0,59</b>                    | <b>0,65</b>                    | <b>0,60</b>                     | <b>0,50</b>                     | <b>0,41</b>                     | 0,32                            | 0,24                            | 0,14                            | -0,02                           | -0,17                           | -0,28                           | -0,20                           | -0,02                           | 0,15                 |
| tm1 <sub>moy</sub> | 0,09                           | 0,11                           | 0,11                            | 0,12                            | 0,11                            | 0,11                            | 0,13                            | 0,16                            | 0,23                            | 0,32                            | <b>0,42</b>                     | <b>0,54</b>                     | <b>0,55</b>                     | 0,38                 |
| Af1 <sub>moy</sub> | 0,14                           | 0,27                           | 0,36                            | <b>0,41</b>                     | <b>0,41</b>                     | <b>0,43</b>                     | <b>0,45</b>                     | <b>0,46</b>                     | <b>0,47</b>                     | <b>0,45</b>                     | <b>0,42</b>                     | <b>0,48</b>                     | <b>0,53</b>                     | <b>0,46</b>          |
| Raf <sub>moy</sub> | -0,25                          | 0,20                           | <b>0,52</b>                     | <b>0,67</b>                     | <b>0,74</b>                     | <b>0,77</b>                     | <b>0,76</b>                     | <b>0,72</b>                     | <b>0,60</b>                     | 0,29                            | -0,03                           | -0,07                           | 0,37                            | <b>0,57</b>          |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

### 4.3.1.3.2.2 Corrélations entre les paramètres sélectionnés et les données oxygène issues du bioréacteur et du sitoxygraphe

Les résultats présentés dans le tableau 42 montrent que les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> (V<sub>i</sub>O<sub>2s</sub>) initiales sont corrélées avec le raffermissement de la pâte (Raf), la meilleure corrélation étant obtenue avec V<sub>8</sub>O<sub>2s</sub> et V<sub>10</sub>O<sub>2s</sub> (r = 0,73). Les V<sub>i</sub>O<sub>2s</sub> initiales sont aussi corrélées avec l'affaiblissement (Af1), mais avec des coefficients de corrélation moins élevés (r < 0,52). En revanche, la valeur des coefficients de corrélation devient meilleure (r = 0,61 avec V<sub>16</sub>O<sub>2s</sub>) avec les V<sub>i</sub>O<sub>2s</sub> intermédiaires et finales. De même, les V<sub>i</sub>O<sub>2s</sub> finales sont corrélées avec le temps d'apparition du minimum (tm1). Ces résultats indiquent que les systèmes redox de la pâte modifient les paramètres de couple de la pâte tout au long du pétrissage. L'action du système lipoxygénasique, probablement prépondérante dans la phase initiale, se traduit par un effet raffermissant en fin de pétrissage (polymérisation). La participation des systèmes secondaires d'oxydation devient quant à elle prépondérante en fin de pétrissage. Elle pourrait être due à l'oxydation de PUFA par les composés hématiniques.

Ces résultats montrent que l'intensité des réactions d'oxydation, après un affaiblissement initial, provoque une structuration de la pâte qui tend à la renforcer. Ce résultat intéressant nécessite d'autres analyses des pâtes pour déterminer l'origine du phénomène. *A priori*, par l'intermédiaire de réactions d'oxydation, les ponts disulfures formés seraient plutôt destructurants dans un premier temps (faisant intervenir des molécules de faible poids moléculaire) puis structurants. Il y aurait une sorte de dépolymérisation initiale utile pour favoriser des réarrangements moléculaires favorisant les liaisons rhéologiquement actives.

Avec les données O<sub>2</sub> issues du bioréacteur, des corrélations similaires sont trouvées (tableau 43) : corrélations faibles entre Af1 et les V<sub>i</sub>O<sub>2b</sub> avec des coefficients qui augmentent légèrement en fin de pétrissage (r = 0,53 avec V<sub>52</sub>O<sub>2b</sub>), corrélations fortes entre Raf et les V<sub>i</sub>O<sub>2b</sub> initiales et intermédiaires (r = 0,77 avec V<sub>24</sub>O<sub>2b</sub>), et corrélations faibles entre tm1 et les V<sub>i</sub>O<sub>2b</sub> finales. De plus, le maximum de couple CM1 est corrélé avec les V<sub>i</sub>O<sub>2b</sub> initiales (r = 0,65 avec V<sub>8</sub>O<sub>2b</sub>). Ces résultats confortent ceux du sitoxygraphe.

Ces résultats vont dans le sens d'une dépolymérisation du réseau protéique (Graveland *et al.*, 1985) lors du pétrissage, favorisé par des contraintes mécaniques, la possibilité d'échanger des liaisons disulfures et d'oxyder les résidus thiols libres. De plus, le lien entre les vitesses initiales de consommation d'O<sub>2</sub> et le raffermissement de la pâte confirmerait les effets

**Tableau 44** Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents et les teneurs en PUFA endogènes de la farine.

|                    | AGL <sub>PUFA</sub> | MAG <sub>PUFA</sub> | DAG <sub>1,3</sub><br>PUFA | DAG <sub>1,2</sub><br>PUFA |
|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| CM1 <sub>moy</sub> | 0,29                | 0,32                | 0,31                       | 0,36                       |
| tm1 <sub>moy</sub> | -0,07               | 0,32                | -0,07                      | -0,05                      |
| Af1 <sub>moy</sub> | 0,29                | -0,40               | 0,28                       | 0,28                       |
| Raf <sub>moy</sub> | <b>0,76</b>         | <b>0,57</b>         | <b>0,64</b>                | <b>0,52</b>                |

**En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %**

**Tableau 45.** Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents avec les paramètres du consistographe de chopin (54 % d'eau distillée pour 100 g de farine).

|                    | Consistographe® de Chopin |                    |              |
|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------|
|                    | Pr <sub>MAX</sub>         | t <sub>PrMAX</sub> | Stab         |
| CM1 <sub>moy</sub> | <b>0,86</b>               | <b>-0,56</b>       | 0,24         |
| tm1 <sub>moy</sub> | -0,15                     | <b>0,75</b>        | <b>-0,60</b> |
| Af1 <sub>moy</sub> | -0,08                     | <b>0,64</b>        | <b>-0,66</b> |
| Raf <sub>moy</sub> | -0,23                     | 0,11               | 0,24         |

**En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %**

rhéologiques attribués à l'oxydation des acides gras par la lipoxygénase (Hoseney *et al.*, 1980).

### 4.3.1.3.2.3 Corrélations entre les paramètres pertinents et les activités enzymatiques endogènes

D'après les observations réalisées dans le paragraphe précédent, montrant une participation des phénomènes oxydatifs dans les valeurs de couple moyen, les liens entre ces paramètres de couple et les activités oxydoréductrices de la farine et de la pâte ont été recherchés. Aucune corrélation n'est déterminée entre l'activité LOX endogène de la farine, la diminution en activité due aux pétrissages (l'activité LOX est très constante dans l'ensemble des variétés étudiées, donc peu discriminante). En revanche, l'activité POD endogène de la farine est corrélée avec tm1 et Af1 ( $r = 0,75$  et  $0,5$ ) confirmant l'hypothèse de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) par les composés hématiniques, particulièrement ceux apportés par la POD.

### 4.3.1.3.2.4 Corrélations entre les paramètres pertinents et les teneurs en lipides des farines et des pâtes

Le tableau 44 présente les corrélations de Pearson entre les paramètres de couple les plus pertinents et les PUFA des farines (seules les fractions montrant une corrélation sont représentées). Seul Raf est corrélé avec les PUFA des fractions AGL ( $r = 0,76$ ) et MAG ( $r = 0,57$ ), tous deux substrats directs de la LOX, confirmant la contribution du système lipoxygénasique au raffermissement de la pâte. Le fait que les PUFA des fractions DAG1,3 et DAG1,2 soient corrélés avec Raf ( $r = 0,64$  et  $0,52$ , respectivement) peut paraître surprenant puisque ces derniers ne sont pas substrats de la LOX. Ceci indique une possible oxydation de ces derniers par les composés hématiniques ou par oxydation couplée via le système LOX. Par ailleurs, aucune corrélation n'est déterminée avec les données concernant les caroténoïdes endogènes ou oxydés (résultat non montré).

### 4.3.1.3.2.5 Corrélations entre les paramètres pertinents et les paramètres de rhéologie empirique.

Sont regroupés sous le terme paramètres de rhéologie empirique, les paramètres fournis par les données issues du consistographe<sup>®</sup> de Chopin, ainsi que les paramètres déterminés lors des tests à l'alvéographe<sup>®</sup> de Chopin et au farinographe<sup>®</sup> de Brabender.

## Résultats et Discussions

Tableau 46. Corrélations de Pearson entre les paramètres de couple moyen de la première phase de pétrissage au sitoxygraphe avec les paramètres déterminés au farinographe (22 observations complètes) et à l'alvéographe (22 observations complètes).

|                    | Farinographe® (brabender) |              |              | Alvéographe® (Chopin) |              |              |              |
|--------------------|---------------------------|--------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
|                    | Hyd                       | Stab int     | AFF 12       | W                     | G            | P            | P/L          |
| CM1 <sub>moy</sub> | -0,16                     | 0,27         | 0,02         | <b>-0,63</b>          | 0,20         | <b>-0,45</b> | -0,35        |
| tm1 <sub>moy</sub> | <b>0,55</b>               | -0,28        | 0,24         | <b>0,75</b>           | <b>-0,70</b> | <b>0,82</b>  | <b>0,83</b>  |
| Af1 <sub>moy</sub> | -0,01                     | <b>-0,46</b> | 0,10         | 0,32                  | -0,34        | 0,34         | <b>0,42</b>  |
| Raf <sub>moy</sub> | <b>-0,81</b>              | -0,28        | <b>-0,64</b> | -0,33                 | <b>0,77</b>  | <b>-0,71</b> | <b>-0,76</b> |

En gras, corrélation significative avec un niveau de confiance de 95 %

Les pâtes pétries au consistographe<sup>®</sup> Chopin sont constituées de 280 g de farine, 54 % d'eau distillée et 2 % de chlorure de sodium pour 100 g de farine. Le maximum de couple (CM1) est corrélé positivement avec la pression maximale mesurée au consistographe<sup>®</sup> (tableau 45) avec un coefficient de corrélation de 0,86, montrant une analogie entre la consistance maximale atteinte après la formation de la pâte dans ces deux pétrins. De plus, le temps d'apparition du minimum de couple (tm1) est corrélé positivement avec le temps d'apparition du pic de consistance au consistographe<sup>®</sup> ( $r = 0,75$ ). Enfin, le paramètre de stabilité (Stab) est négativement corrélé avec l'affaiblissement (Af1), ainsi, plus la pâte s'affaiblit au sitoxygraphe dans la phase initiale de pétrissage, moins elle est stable au consistographe<sup>®</sup> ( $r = -0,66$ ). Ces résultats montrent une analogie évidente entre les paramètres mesurés au sitoxygraphe et au consistographe<sup>®</sup>.

Concernant les corrélations entre les paramètres de couple du sitoxygraphe et les paramètres obtenus au farinographe<sup>®</sup>, les corrélations obtenues entre l'hydratation (Hyd) et tm1 et entre Hyd et Raf sont difficilement interprétables, bien que celle-ci soit de  $-0,81$  pour ces derniers. En effet, au farinographe<sup>®</sup>, l'hydratation est ajustée de manière à obtenir une consistance de 500 UB au niveau du pic de développement de la pâte. Dans le cas du sitoxygraphe, la quantité d'eau ajoutée est constante quelle que soit la farine, sans tenir compte de la teneur en eau de celle-ci. Il est cependant intéressant de noter des corrélations entre l'affaiblissement (Af1) au sitoxygraphe et la stabilité (Stab int) au farinographe<sup>®</sup> ( $r = -0,46$ ), indiquant que plus la farine est stable au farinographe<sup>®</sup>, moins son affaiblissement dans la phase initiale de pétrissage au sitoxygraphe est importante. Dans le même ordre d'idée, plus l'affaiblissement à 12 min après le pic de développement au farinographe<sup>®</sup> est petit, plus le raffermissement de la pâte (Raf) au sitoxygraphe est grand ( $r = -0,64$ ). Ces résultats sont encourageants, mais nécessitent de travailler dans des conditions similaires, c'est-à-dire adapter l'hydratation au sitoxygraphe pour obtenir des valeurs de CM1 constante quelles que soient les farines, ou ajouter une quantité d'eau similaire à celle déterminée au farinographe<sup>®</sup>. Dans ce cas, les corrélations devraient être améliorées.

Les corrélations obtenues entre les paramètres de couple du sitoxygraphe mesurés lors du pétrissage peuvent par ailleurs être recherchées avec les paramètres mesurés lors du test à l'alvéographe<sup>®</sup> (tableau 46). Le rapport P/L (indice de viscoélasticité) est corrélé positivement ( $r = 0,83$ ) avec le temps d'apparition du minimum de couple (tm1), tandis qu'il est négativement corrélé ( $r = -0,76$ ) avec le raffermissement (Raf). Plus précisément, il semble que tm1 permette de prédire le caractère élastique (ténacité) d'une pâte, puisqu'il est corrélé positivement avec P ( $r = 0,82$ ). Au contraire, Raf serait plutôt relié aux propriétés

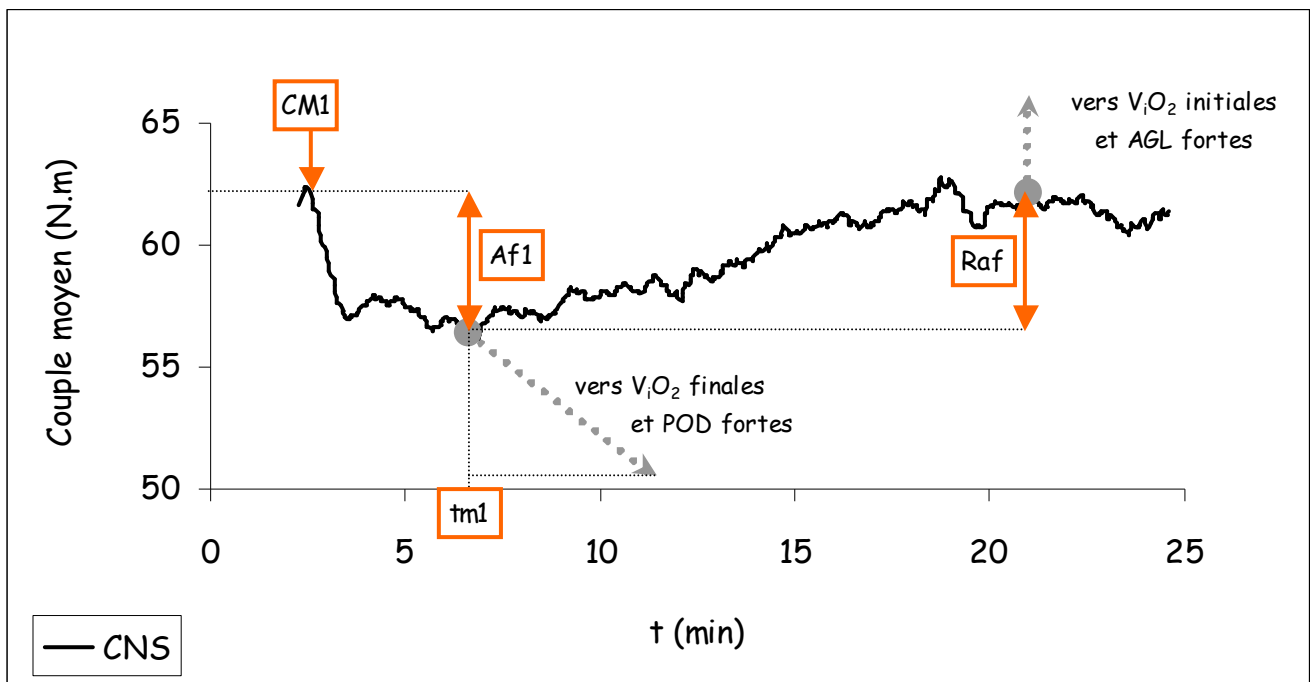


Figure 107. Contribution des phénomènes oxydatifs aux variations des paramètres de consistance : synthèse des corrélations entre les données d'oxygène et les paramètres de couple mesurés au sitographe.

d'extensibilité de la pâte ( $r = 0,77$  avec G). On peut rappeler que  $tm1$  et Af1 sont corrélés entre eux ( $r = 0,62$ ), expliquant probablement la corrélation obtenue entre Af1 et P/L ( $r = 0,42$ ). Les paramètres W et P sont aussi corrélés entre eux ( $r = 0,99$ , donnée non montrée) expliquant les corrélations similaires trouvées entre CM1 et W (ou P), ou  $tm1$  et ces paramètres.

Les corrélations entre les paramètres de couple du sitoxygraphe et les données de rhéologies empiriques permettent donc de mettre en évidence des similitudes entre les comportements des pâtes dans ces différents appareils. De toute évidence, ces résultats sont à confirmer, notamment en tenant compte des conditions de préparation des pâtes différentes entre le sitoxygraphe et les différents appareils de rhéologie. Dans ces conditions, les corrélations entre les mesures de consommation d'O<sub>2</sub> et les paramètres rhéologiques pourraient devenir plus robustes.

### 4.3.1.3.2.6 Corrélations entre les paramètres pertinents et l'état d'agrégation des protéines des farines et pâtes

De faibles corrélations sont observées vis-à-vis des données protéines des farines (données non montrées) et les paramètres de couple sélectionnés. Seul le raffermissement (Raf) est corrélé avec le rapport F1/F2 (gluténines de haut poids moléculaires/ gluténines de faibles poids moléculaires).

En conclusion, la mesure de la consommation et des vitesses de consommation d'oxygène pendant le pétrissage pour un ensemble de 13 farines de composition biochimique différente a permis de discriminer ces farines d'après leurs paramètres de consommation d'O<sub>2</sub>. Les phénomènes d'oxydation intervenant au cours du pétrissage sont comparables pour les deux types de pétrissage réalisés au sitoxygraphe et au bioréacteur. Au niveau biochimique, les vitesses initiales de consommation d'oxygène sont principalement expliquées par la teneur en PUFA de la fraction AGL des farines. Il est aussi probable que des systèmes secondaires (composés hématiniques notamment) participent aux réactions d'oxydation. De plus, des corrélations ont été mises en évidence entre les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> et les paramètres de couple définis au sitoxygraphe. Ce résultat confirme la participation des phénomènes oxydatifs dans l'acquisition des propriétés de la pâte. Une synthèse est présentée dans la figure 107 résumant les liens entre données oxygène et paramètres de couple du sitoxygraphe. Par ailleurs, la possibilité de corréler les paramètres du sitoxygraphe avec des données de rhéologie classique permet d'entrevoir la possibilité de relier les phénomènes





biochimiques intervenant au cours du pétrissage aux propriétés des pâtes et au comportement technologique des farines en panification.

#### **4.3.2 Etude variétale 2002 et 2003 (*annexe 5*)**

Cette étude variétale a été réalisée uniquement avec le bioréacteur sur un ensemble de 12 farines dont 10 de variétés pures (5 en 2002 et 5 en 2003) et 2 commerciales (1 par année de récolte). L'objectif de cette étude est double, permettre la discrimination des farines selon des critères de consommation d'oxygène et selon des paramètres de couple. Un lien entre les paramètres mesurés au bioréacteur et les caractéristiques biochimiques ou technologiques des farines est recherché. Cette étude fait l'objet d'une article publié fourni dans l'annexe 5.

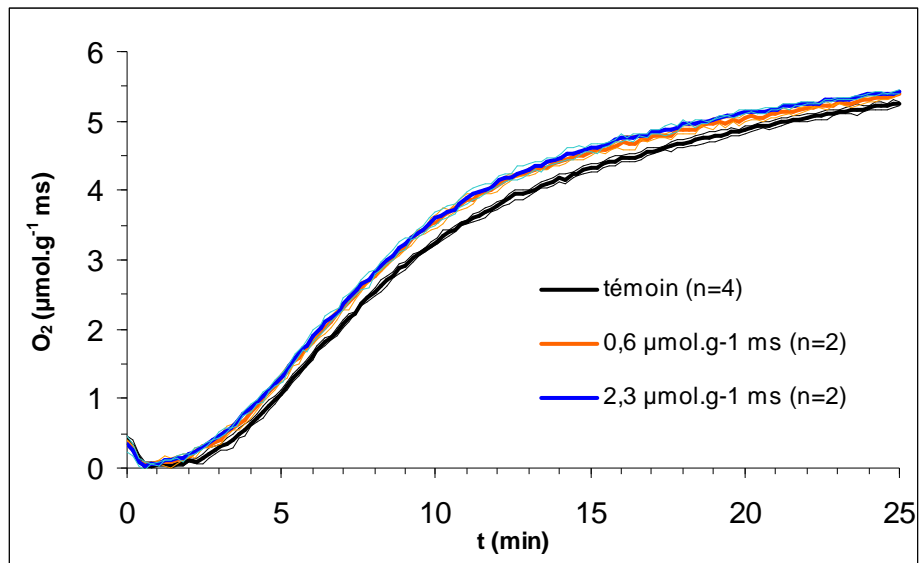


Figure 108. Effet de l'ajout d'acide L-*Thréo* ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$ ) sur la courbe de consommation d' $O_2$ . les courbes moyenne  $\pm$  ET des 3 essais sont représentées en traits fins.

#### **4.4 Effets de l'addition d'améliorants connus sur les différentes paramètres mesurés au sitoxygraphe**

L'objectif de cette partie n'est pas de décrire en détail l'effet d'un paramètre de la formulation, mais de faire varier la composition de la pâte, pour travailler sur des pâtes possédant des propriétés très différentes. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les effets d'additifs connus (acide ascorbique, cystéine, bromate et azodicarbonamide (ADA)) ainsi que de glucose oxydase. La plupart des additifs et enzymes utilisés ont déjà été caractérisés en milieu modèle et ajoutés dans des pâtes pétries avec le bioréacteur (Ameille *et al.*, 2000a ; Louarme, 2001 ; Eyoum, 2002), pour tenter d'apporter des explications sur les mécanismes d'oxydo-réduction au sein de la pâte. Dans le cadre de la mise au point du sitoxygraphe, le but est de fournir quelques points de comparaison avec une mesure des phénomènes pendant le pétrissage dans des conditions classiques d'hydratation et d'apport d'énergie à la pâte (au sitoxygraphe). Lorsque cela a été possible, pour asseoir cette comparaison en travaillant sur les mêmes farines, les effets ont également été mesurés au bioréacteur, la seule différence était la teneur en eau de la pâte.

##### **4.4.1 Influence de l'ajout de composés redox sur les propriétés des pâtes**

Pour chaque additif étudié, les conditions de pétrissage sont les mêmes que celles utilisées pour pétrir la farine témoin (CNS). La pâte a une masse totale de 4 kg, la quantité d'eau ajoutée représente 60 % de la masse de farine, la masse de NaCl représente 1,8 % de cette masse. Le pétrissage est effectué pendant 25 min comprenant 2 min de frasage à 30 rpm suivies de 23 min à 52,5 rpm. Chacun des substrats redox est dissous soit directement dans l'eau distillée (AA, Cys, bromate) soit sous forme concentrée dans du tampon acétate à pH 5,6 (cas de l'acide férulique, AF).

##### **4.4.1.1 Ajout d'acide ascorbique**

Deux doses d'acide L(+)-ascorbique ont été incorporées, dissoutes dans l'eau distillée, à savoir 100 et 400 ppm (base farine). Ces quantités ajoutées représentent respectivement 0,6 et 2,3  $\mu\text{mol}_{\text{AA}}\cdot\text{g}^{-1}$  ms.

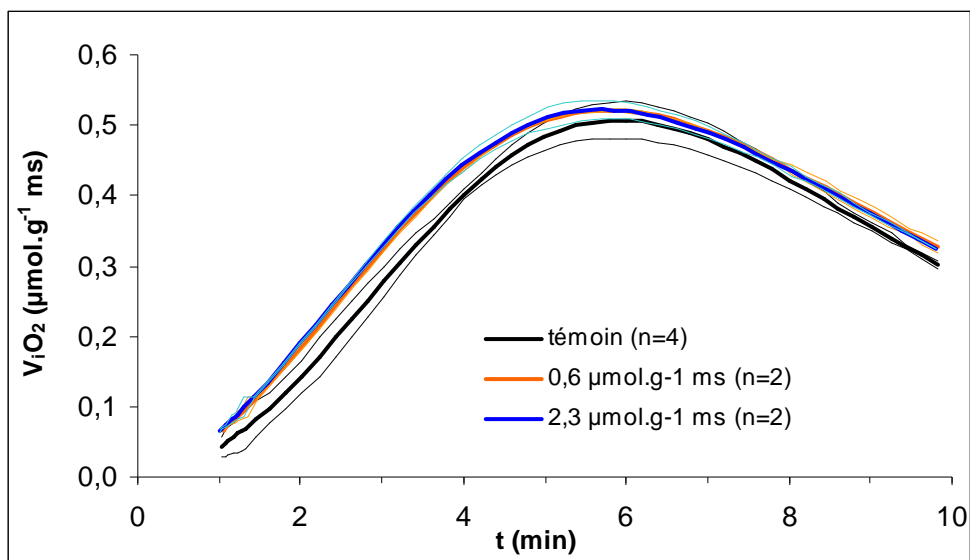


Figure 109. Effet de l'ajout d'acide L-Thréo ascorbique ( $0,6$  et  $2,3 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ ) sur la vitesse de consommation d' $O_2$  dans la partie initiale du pétrissage. les courbes moyenne  $\pm$  ET des 3 essais sont représentées en traits fins.

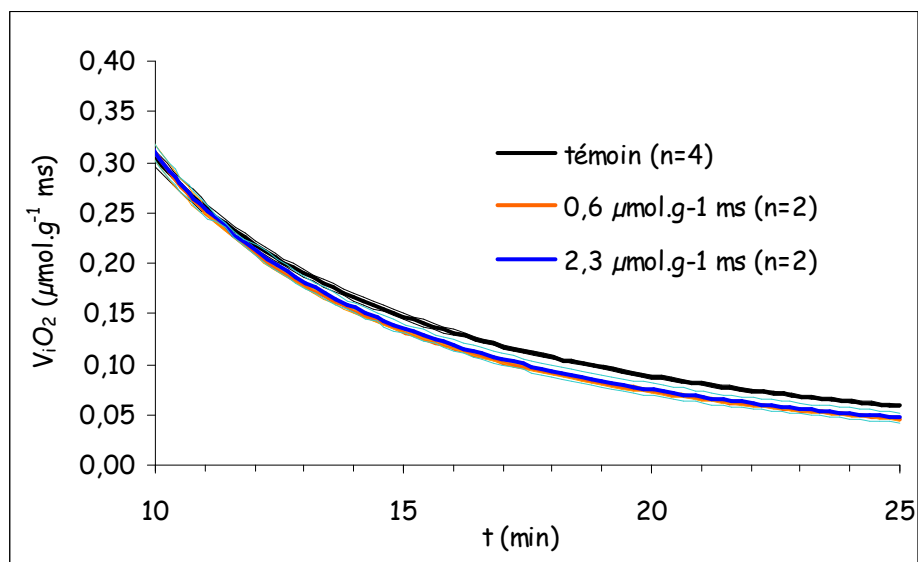


Figure 110. Effet de l'ajout d'acide L-Thréo ascorbique ( $0,6$  et  $2,3 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ ) sur la vitesse de consommation d' $O_2$  dans la partie finale du pétrissage. Les courbes moyenne  $\pm$  ET de 3 essais sont représentées en traits fins.

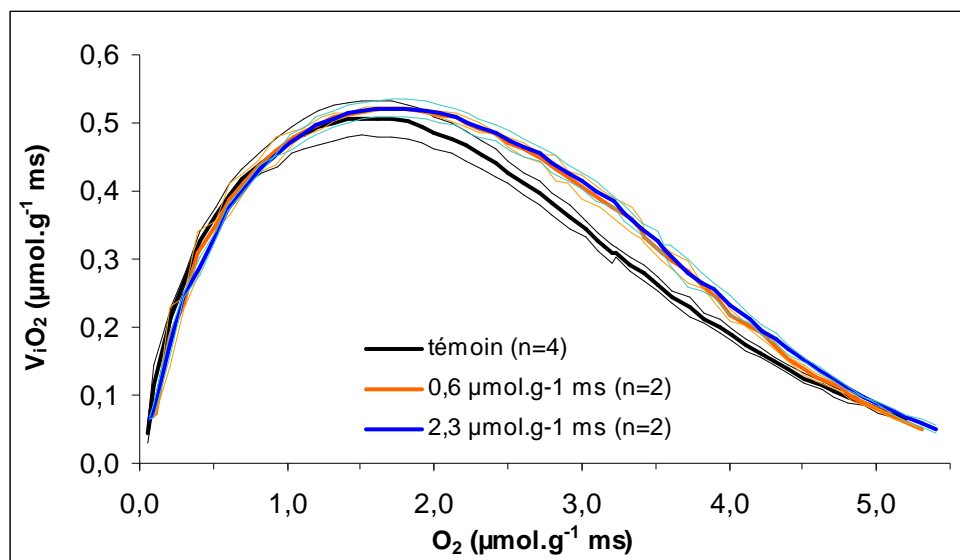


Figure 111. Effet de l'ajout d'acide L-Thréo ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ ) sur la vitesse de consommation d' $O_2$  exprimée en fonction de l'oxygène consommé dans la pâte pendant le pétrissage. Les courbes moyenne  $\pm$  ET de 3 essais sont représentées en traits fins.

Tableau 47. Effets de l'ajout de l'AA sur les paramètres extraits de la courbe  $V_{O_2} = f(O_2)$  (les pâtes supplémentées en acide ascorbique sont répétées deux fois).  $V_{O_2MAX}$  exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ ,  $t_{VO_2MAX}$  exprimée en min,  $O_{2VO_2MAX}$  exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ .  $Stab_{tO}$  : critères de stabilité correspondant d'une part au laps de temps depuis le début du pétrissage (en min) pendant lequel  $V_iO_2 \geq 0,8 * V_{O_2MAX}$  et d'autre part la quantité d' $O_2$  consommée pendant ce laps de temps ( $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ ).

|   | $V_{O_2MAX}$<br>( $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms.min}^{-1}$ ) | $t_{VO_2MAX}$<br>(min) | $O_{2VO_2MAX}$<br>( $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ ) | $Stab_{tO}$<br>(min) | $Stab_{tO_2}$<br>( $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ ) |
|---|---|------------------------|--|----------------------|---|
| Témoin (n=4)                            | 0,507   | 5,89                   | 1,54   | 8,26                 | 2,62  |
| ET                                      |   | 0,03                   | 0,05   | 0,03                 | 0,22  |
| AA 0,6 $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ | 0,522   | 5,78                   | 1,71   | 8,34                 | 2,90  |
| ET                                      |   | 0,002                  | 0,04   | 0,05                 | 0,06  |
| AA 2,3 $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ms}$ | 0,522   | 5,73                   | 1,70   | 8,29                 | 2,94  |
| ET                                      |   | 0,01                   | 0,01   | 0,03                 | 0,11  |

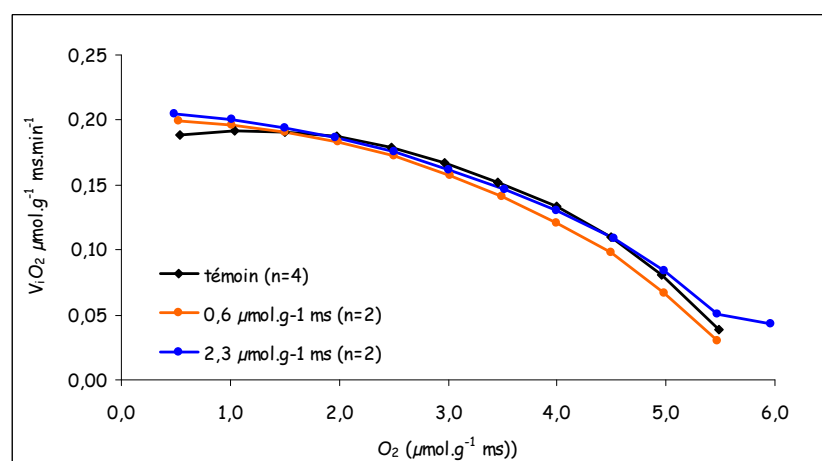
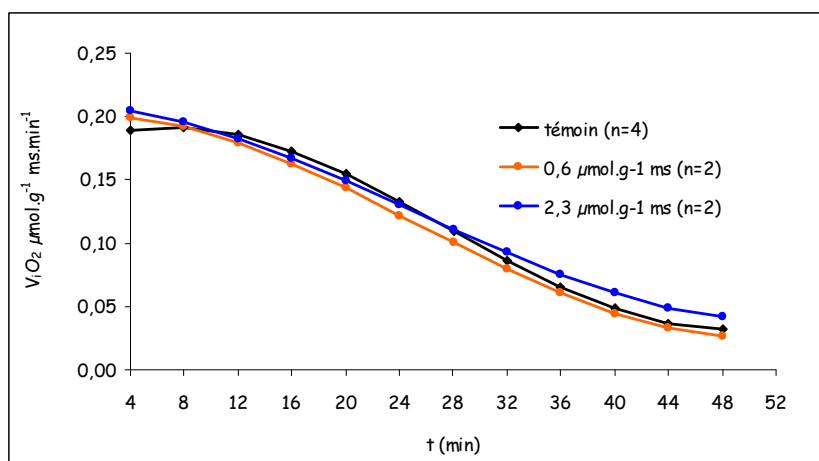
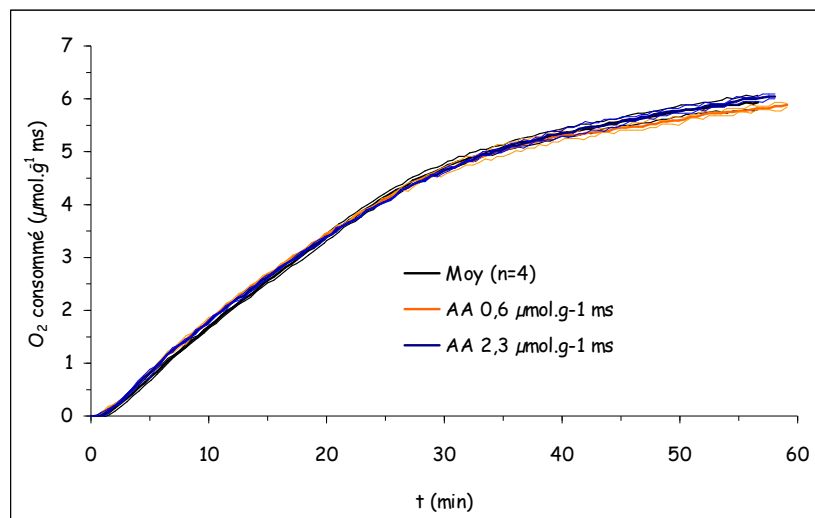


Figure 112. Effet de l'acide ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$  sur la consommation d' $\text{O}_2$  au bioréacteur. A. Courbes de consommation d' $\text{O}_2$ . B. Vitesses de consommation d' $\text{O}_2$  exprimée en fonction du temps. C. Vitesses de consommation d' $\text{O}_2$  exprimée en fonction de l'oxygène consommé.

La figure 108 montre que l'ajout de différentes doses d'acide ascorbique augmente la quantité d'O<sub>2</sub> consommé par rapport au témoin. Une dose croissante d'AA ajouté provoque une augmentation non proportionnelle de l'O<sub>2</sub>TOTAL consommé en fin de pétrissage (5,25 μmol.g<sup>-1</sup> ms consommé par la pâte témoin contre 5,39 et 5,43 μmol.g<sup>-1</sup> ms consommé par la pâte additionnée de 0,6 et 2,3 μmol<sub>AA</sub>.g<sup>-1</sup> ms respectivement (augmentation de consommation de 0,14 et 0,18 μmol.g<sup>-1</sup> ms respectivement). La stœchiométrie de la réaction d'oxydation de l'AA par l'ascorbate oxydase est de 1 mole d'O<sub>2</sub> consommée pour oxyder 2 moles d'AA. Si tout l'AA était consommé, une surconsommation de 0,3 et 1,15 μmol.g<sup>-1</sup> ms devrait être observée. Ameille (1998) a étudié la consommation d'acide ascorbique dans une pâte pétrie au bioréacteur et montre qu'environ la moitié de l'acide ascorbique introduit (1,2 μmol.g<sup>-1</sup> ms) est consommé à la fin du pétrissage. Nos observations sont cohérentes avec ces résultats pour la dose de 0,6 μmol<sub>AA</sub>.g<sup>-1</sup> ms ajoutés mais pas pour la dose supérieure.

Les courbes de consommation d'O<sub>2</sub> de pâte additionnées en AA se superposent parfaitement entre 0 et 10 min de pétrissage (figure 108). Dans la phase initiale, les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> sont identiques lorsqu'on ajoute l'acide ascorbique (figure 109). Ceci implique qu'en sa présence, la quantité de réactions d'oxydation augmente (écart quasi-constant de vitesses entre 2 et 6 min). De plus, la vitesse maximale est légèrement supérieure en présence d'acide ascorbique et la diminution de vitesse de consommation après le passage par la V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>MAX est réduite en présence d'acide ascorbique. Ce n'est qu'en fin de pétrissage, après 11 min, que les vitesses instantanées de consommation d'oxygène des pâtes contenant de l'acide ascorbique deviennent légèrement inférieures à celles de la pâte témoin (figure 110).

Pour les différents essais, lorsqu'on exprime les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> en fonction de la quantité d'O<sub>2</sub> consommé (figure 111), celles-ci sont légèrement inférieures en présence d'acide ascorbique quand la quantité d'O<sub>2</sub> consommé est inférieure à 1 μmol.g<sup>-1</sup> ms. De plus, après avoir atteint le V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>MAX, la présence d'acide maintient une vitesse de consommation importante pour des quantités d'O<sub>2</sub> consommées comprises entre 2 et 4 μmol.g<sup>-1</sup> ms, et en fin de pétrissage, quand 4,5 μmol.g<sup>-1</sup> ms d'O<sub>2</sub> sont consommés, les vitesses instantanées de consommation sont identiques pour toutes les pâtes.

En conclusion (tableau 47), l'ajout d'acide ascorbique dans la pâte augmente l'intensité des réactions d'oxydation dans la pâte (V<sub>O2</sub>MAX légèrement supérieur, quantité d'O<sub>2</sub> consommée au V<sub>O2</sub>MAX plus importante), accélère les réactions d'oxydation (diminution du temps d'apparition de la vitesse maximale d'oxydation dépendant de la dose ajoutée). L'action de l'acide ascorbique est principalement visible en début de pétrissage,



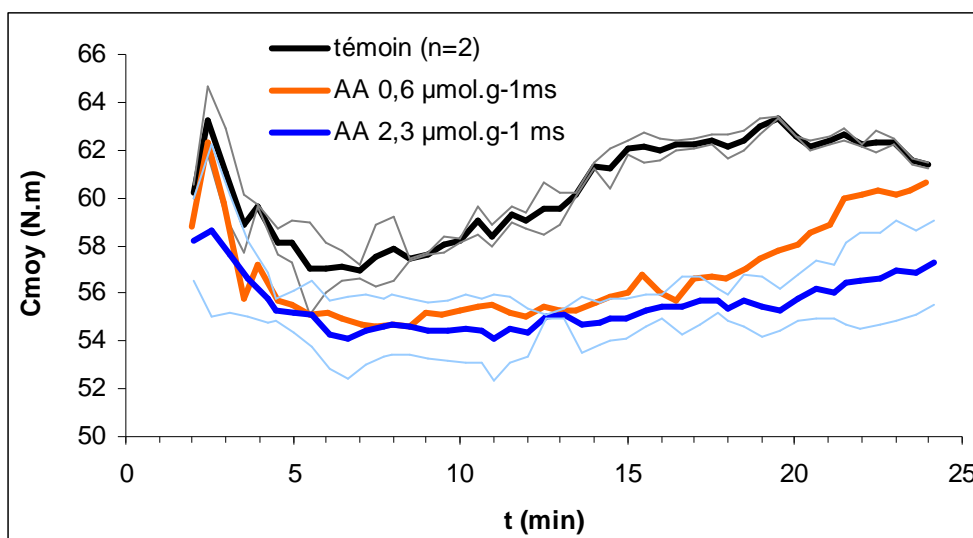


Figure 113. Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage

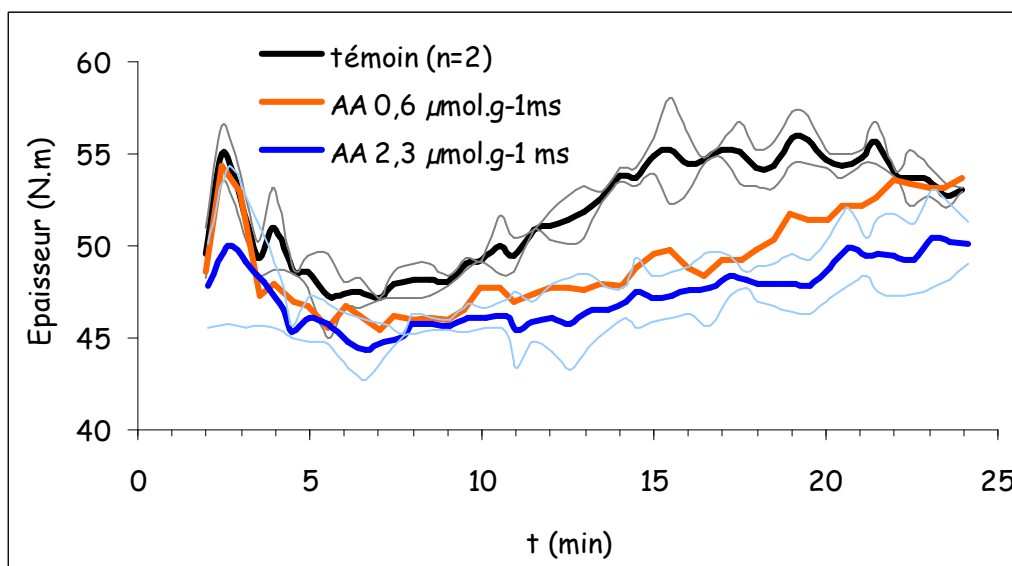


Figure 114. Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'évolution de l'épaisseur de la courbe de couple pendant le pétrissage

Tableau 48. Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'évolution du couple pendant le pétrissage.

|                                | CM1 <sub>moy</sub> | tM1 <sub>moy</sub> | St1 <sub>moy</sub> | Cm1 <sub>moy</sub> | tm1 <sub>moy</sub> | Af1 <sub>moy</sub> | CM2 <sub>moy</sub> | tM2 <sub>moy</sub> | Cm2 <sub>moy</sub> | tm2 <sub>moy</sub> |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Témoin (n=2)</b>            | 64,2               | 2,4                | 0,5                | 56,2               | 6,2                | 8,0                | 63,6               | 19,4               | 61,1               | 24,2               |
| <b>ET</b>                      | 0,85               | 0,02               | 0,12               | 0,93               | 0,91               | 0,08               | 0,08               | 0,24               | 0,29               | 0,29               |
| AA 0,6 µmol.g <sup>-1</sup> ms | 63,3               | 2,4                | 0,4                | 54,4               | 7,4                | 8,9                | 61,0               | 23,8               | 60,4               | 24,2               |
| <b>ET</b>                      | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 | nd                 |
| AA 2,3 µmol.g <sup>-1</sup> ms | 59,6               | 2,6                | 1,5                | 54,0               | 9,6                | 5,6                | 57,2               | 23,2               | 56,7               | 23,3               |
| <b>ET</b>                      | 3,06               | 0,20               | 1,07               | 1,47               | 4,64               | 1,58               | 2,30               | 0,80               | 1,71               | 0,16               |

l'instant où la vitesse de consommation devient inférieure à 80 % de la  $V_{O_2MAX}$  est identique ( $Stab_{t_0} = 8,3$  min pour toutes les conditions) alors que l'ajout d'acide ascorbique provoque une augmentation de plus de 10 % du critère de stabilité exprimée en fonction de l' $O_2$  consommé ( $stab_{t_0O_2}$ ). L'ajout d'acide ascorbique dans la pâte ouvre une nouvelle voie d'oxydation, voie en compétition par rapport à celle déjà existante dans des pâtes non supplémentées. En effet, ce substrat redox (acteur dans la compétition sur la consommation d' $O_2$ ) joue le rôle d'inhibiteur en ralentissant l'oxydation de PUFA (Ameille, 1998), tout en accélérant la diminution d'activité LOX (Delcros *et al.*, 1998). Il déplace probablement les équilibres chimiques dans les réactions d'oxydation couplées en oxydant les thiols de bas poids moléculaires en disulfures (Grosch et Wieser, 1999 ; Koehler, 2003a, 2003b) et en modifiant le potentiel redox dans la pâte (Potus, 1997). Les mêmes expérimentations réalisées au bioréacteur conduisent à des différences beaucoup moins marquées (figure 112), ceci est probablement lié à la limitation de la vitesse d'incorporation d' $O_2$  dans la pâte pétrie au bioréacteur.

L'ajout de l'acide ascorbique affaiblit les valeurs du couple. En effet à tout instant, les valeurs de couple du témoin sont supérieures à celles du couple des pâtes avec acide ascorbique (figure 113). Après le pic de consistance, puis un passage des valeurs de couple par un minimum vers 6 min pour la courbe témoin, on observe une reprise des valeurs de couple après 10 min. Il semble que dès que l'on ajoute de l'acide ascorbique le phénomène de reprise soit décalé vers des temps de plus en plus longs. Ainsi, la réaugmentation des valeurs de couple ne se produit quasiment pas pendant les 25 min de pétrissage en présence de  $2,3 \mu\text{mol.g}^{-1}$  ms d'acide ascorbique.

Les courbes d'épaisseur de couple pour les essais avec et sans acide ascorbique conduisent à des observations similaires à celles faites avec les courbes de couple moyen (figure 114).

D'après le tableau 48, l'ajout d'acide ascorbique n'a pas d'effet notable en début de pétrissage, puisqu'aucun des paramètres calculés n'est significativement différent de ceux obtenus pour la courbe témoin. Celle-ci présente un pic de consistance à 64,2 N.m qui intervient environ 30 s après le début du pétrissage à grande vitesse. 30 s plus tard ( $t = 2,9$  min) les valeurs de couple sont inférieures à 95 % de celles du pic de consistance et l'affaiblissement a lieu très rapidement dans un premier temps puis ralentit pour atteindre un minimum du couple (56,2 N.m) à  $t = 6,2$  min, ce qui représente un affaiblissement global de 8 N.m, soit 12,5 % de la valeur maximale. A titre comparatif, l'affaiblissement moyen à 12 min obtenu au farinographe® de Brabender dans le cadre de l'étude variétale 2005 sur 13

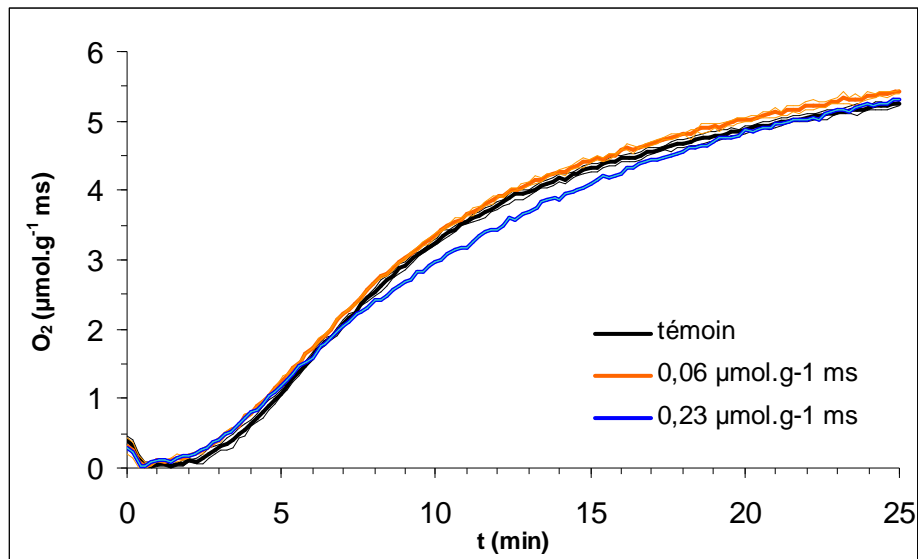


Figure 115. Effet de l'ajout de cystéine (0,06 et 0,23  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ ) sur la courbe de consommation d' $O_2$ . les courbes moyenne  $\pm$  ET sont représentées en traits fins.

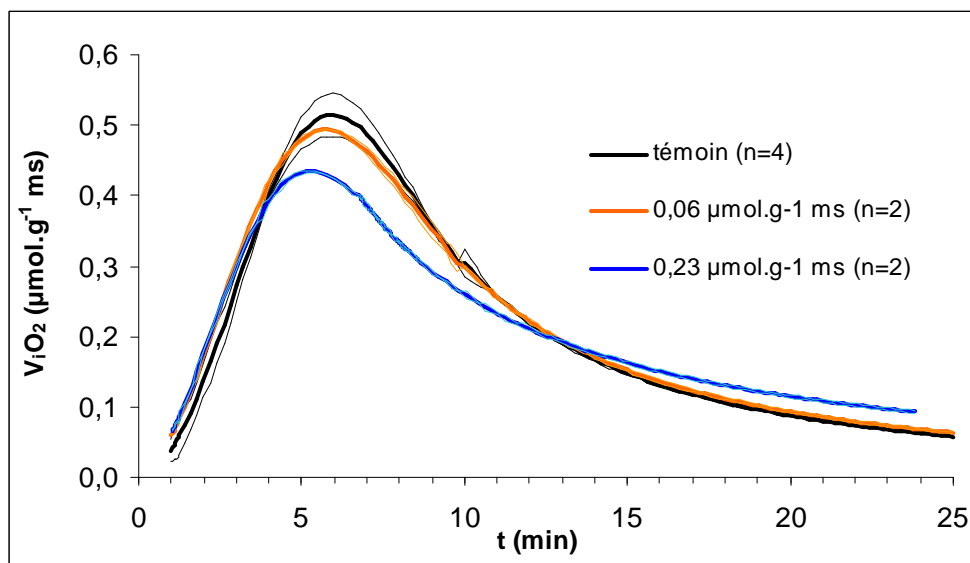


Figure 116. Effet de l'ajout de cystéine (0,06 et 0,23  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ ) sur la vitesse de consommation d' $O_2$  pendant le pétrissage. les courbes moyenne  $\pm$  ET sont représentées en traits fins.

farines est de  $102 \pm 11$  Unités Brabender (soit 20,4 %). La CNS (farine témoin) présente un affaiblissement à 12 min de 16 % (donnée farinographe<sup>®</sup>). Ainsi, sur l'ensemble des variétés, l'affaiblissement mesuré avec le farinographe<sup>®</sup> de Brabender est plus important que celui du sitoxygraphe (valeur moyenne de toutes les variétés).

En revanche, l'action de l'acide ascorbique est visible sur les valeurs de couple après le passage par une valeur minimum vers 7,4 et 9 min (tableau 48). Ainsi, les valeurs de couple moyen tardent à réaugmenter, les valeurs restent faibles dans les pâtes contenant de l'acide ascorbique pendant près de 10 min et le second pic de consistance n'apparaît pas avant la fin du pétrissage. A la dose de  $0,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , la valeur de couple finale est comparable à celle du témoin (environ 60 N.m), signe qu'après un effet affaiblissant, l'acide ascorbique provoque un raffermissement au sein de la pâte. Cet effet apparaît plus tardivement dans le cas de la pâte contenant  $2,3 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'acide ascorbique.

La mesure de la consommation d'O<sub>2</sub> et celle du couple sur une pâte boulangère pétrie au sitoxygraphe, additionnée ou non en acide ascorbique permettent de confirmer que l'acide ascorbique favorise et accélère les réactions d'oxydation dans la pâte dès les premiers instants de pétrissage (figure 109), provoquant un affaiblissement des valeurs de couple dans cette période traduit par des  $t_{m1}$  plus longs (figure 113). Son effet améliorant intervient en fin de pétrissage (dose de  $0,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) par une amélioration de la reprise de consistance plus rapide que la pâte témoin. On peut imaginer que son action améliorante se poursuit pendant la phase de repos de la pâte. A forte dose ( $2,3 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ), cet effet semble retardé.

On sait que l'action de l'acide ascorbique est de permettre l'oxydation des thiols de type GSH, responsables du relâchement de la pâte (Grosch et Wieser, 1999). Si la reprise de couple à la dose de  $0,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  observée en fin de pétrissage confirme cette hypothèse, en revanche, l'effet affaiblissant observé au début est plus difficile à expliquer. Il est possible que l'augmentation de consommation d'O<sub>2</sub> traduise un état de réactivité de la pâte plus important en présence d'acide ascorbique qui entraîne une dépolymérisation accrue des polymères gluténiques (rendant peut-être également plus accessible les thiols de bas poids moléculaires à neutraliser), conduisant à une diminution des valeurs de couple. Une fois l'acide ascorbique consommé, et les GSH oxydés, la polymérisation du gluten pourrait intervenir et de façon plus rapide que dans une pâte témoin en fin de pétrissage.

### **4.4.1.2 Ajout de L-cystéine**

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de deux doses ( $0,06$  et  $0,23 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) de la L-cystéine monohydratée.

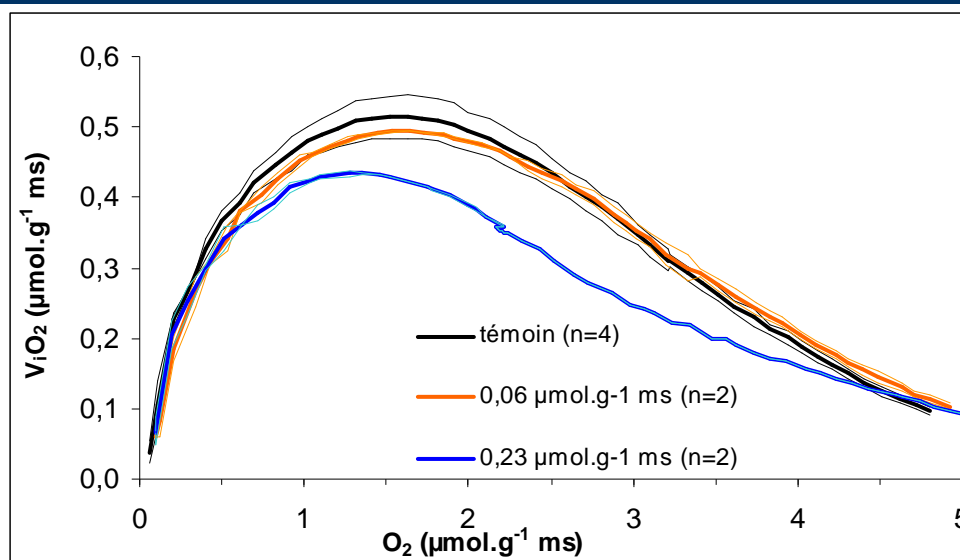


Figure 117. Effet de l'ajout de Cystéine (0,06 et 0,23  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ ) sur la vitesse de consommation d' $\text{O}_2$  exprimée en fonction de l'oxygène consommé dans la pâte pendant le pétrissage. les courbes moyenne  $\pm$  ET sont représentées en traits fins.

Tableau 49. Effets de l'ajout de cystéine sur les paramètres extraits de la courbe  $V_{\text{O}_2} = f(\text{O}_2)$ .  $V_{\text{O}_2\text{MAX}}$  exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms.min}^{-1}$ ,  $t_{\text{VO}_2\text{MAX}}$  exprimée en min,  $\text{O}_{2\text{VO}_2\text{MAX}}$  exprimée en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ .  $\text{Stab}_{t_{\text{O}_2}}$  : critères de stabilité correspondant d'une part au laps de temps depuis le début du pétrissage (en min) pendant lequel  $V_i\text{O}_2 \geq 0,8 * V_{\text{O}_2\text{MAX}}$  et d'autre part la quantité d' $\text{O}_2$  consommée pendant ce laps de temps ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ ).

|   | $V_{\text{O}_2\text{MAX}}$<br>( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms.min}^{-1}$ ) | $t_{\text{VO}_2\text{MAX}}$<br>(min) | $\text{O}_{2\text{VO}_2\text{MAX}}$<br>( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ ) | $\text{Stab}_{t_{\text{O}_2}}$<br>(min) | $\text{Stab}_{t_{\text{O}_2\text{O}_2}}$<br>( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ ) |
|---|---|--------------------------------------|---|---|--|
| Témoin (n=4)                              | 0,507   | 5,89                                 | 1,54  | 8,26                                    | 2,62   |
| ET  | 0,03  | 0,05                                 | 0,03  | 0,22                                    | 0,09   |
| Cys 0,06 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ | 0,494   | 5,73                                 | 1,60  | 8,25                                    | 2,75   |
| ET  | 0,00  | 0,11                                 | 0,07  | 0,16                                    | 0,06   |
| Cys 0,23 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ ms}$ | 0,434   | 5,28                                 | 1,32  | 7,68                                    | 2,27   |
| ET  | 0,00  | 0,00                                 | 0,00  | 0,00                                    | 0,00   |

L'examen des courbes de consommation d'oxygène obtenue au sitoxygraphe montre que l'ajout de cystéine engendre une légère surconsommation d'O<sub>2</sub> en tout début de pétrissage identique pour les deux doses utilisées (figure 115). Ce phénomène se maintient tout au long du pétrissage pour la faible dose de cystéine tandis que la consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte en présence de 0,23 μmol.g<sup>-1</sup> ms devient inférieure à celle du témoin au-delà de 5 min de pétrissage. On peut tout de même noter qu'en fin de pétrissage, les quantités totales d'O<sub>2</sub> consommées par toutes les pâtes sont très proches (environ 5,2 μmol.g<sup>-1</sup> ms). Les effets de l'ajout de cystéine sont plus nets sur les courbes de vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> (figure 116). En tout début de pétrissage et quelle que soit la dose, on peut observer une activation des systèmes consommateurs d'O<sub>2</sub>, cet effet est dépendant du temps, c'est-à-dire que plus la dose de cystéine ajoutée est grande, plus l'effet sur l'augmentation des vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> est court. Pour la dose 0,23 μmol.g<sup>-1</sup> ms de cystéine ajoutée dans la pâte, la courbe de vitesse de consommation est caractérisée par une vitesse maximale observée plus tôt et inférieure à celle du témoin, et une diminution de vitesse moins importante puisque après 13 min, les ViO<sub>2</sub> deviennent supérieures à celles du témoin. Quand on exprime les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> des différentes pâtes en fonction de la quantité d'O<sub>2</sub> consommé, on s'aperçoit qu'au fort dosage en cystéine, les ViO<sub>2</sub> sont systématiquement inférieures à celles du témoin quelle que soit la quantité d'O<sub>2</sub> consommée sauf en tout début de pétrissage où elles sont identiques au témoin (figure 117). En conclusion, l'ajout de cystéine à une pâte pétrie au sitoxygraphe et pour une même consommation d'O<sub>2</sub> diminue l'intensité des réactions d'oxydation : diminution de la vitesse maximale d'oxydation, diminution du temps d'apparition du V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>MAX, de la quantité d'O<sub>2</sub> consommé au V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>MAX, et diminution des facteurs de stabilité notamment pour la forte dose de cystéine ajoutée (tableau 49). Ce phénomène est probablement provoqué par l'effet inhibiteur de la cystéine sur la LOX et par conséquent sur le fonctionnement de ce système dans la pâte.

Enfin, dans nos conditions d'expériences aucune différence n'a été détectée entre les paramètres de couple de la pâte témoin et de celles supplémentées en cystéine.

### **4.4.1.3 Ajout d'oxydants chimiques (bromate, ADA)**

Bien que non autorisés en Europe et en France en particulier, pour des raisons de toxicité potentielle, le bromate et l'azo-di-carbonamide sont deux agents oxydants encore largement utilisés dans certains pays. Le bromate permet, entre autres d'améliorer la tolérance

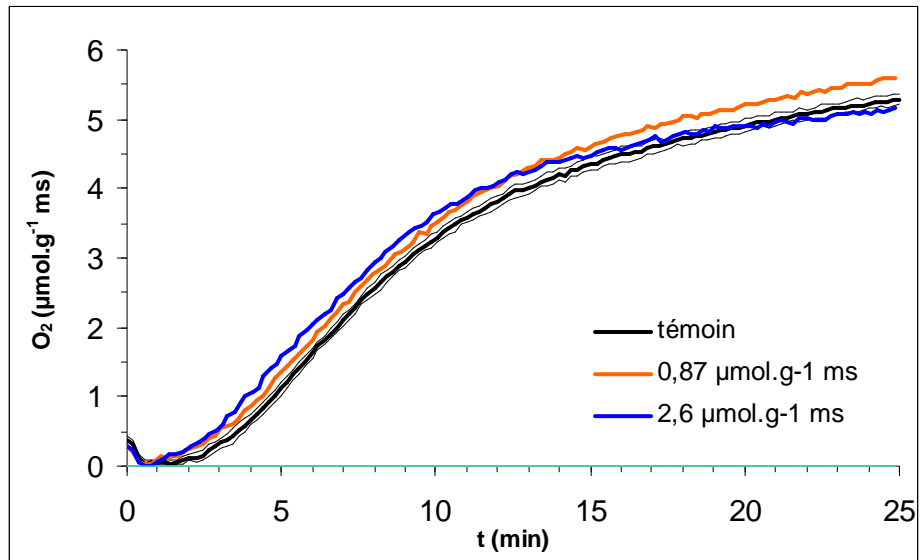


Figure 118. Effet de l'addition de deux doses de bromate de potassium sur le consommation d' $O_2$  de la pâte pétrie au sitoxygraphe.

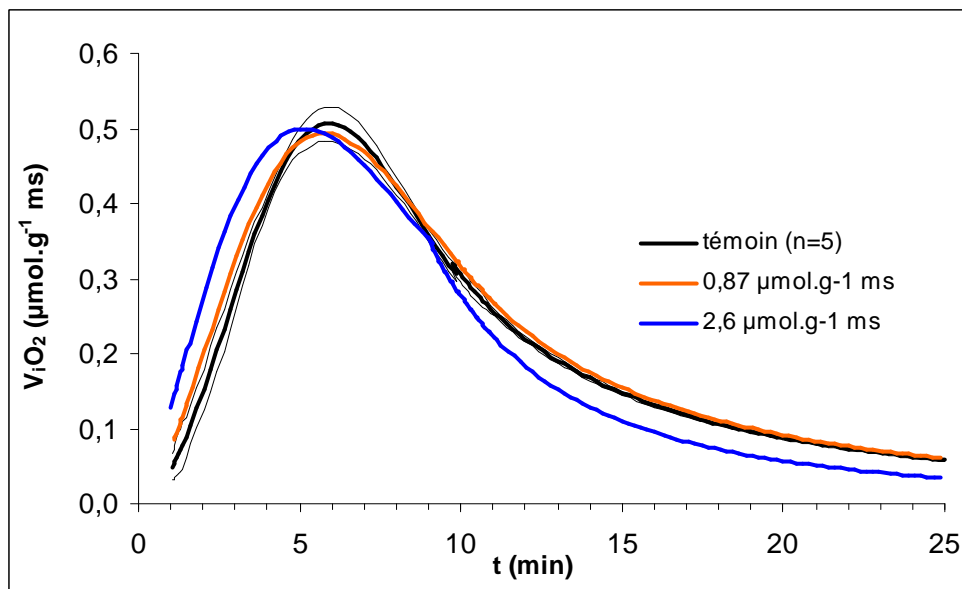


Figure 119. Effet de l'addition de deux doses de bromate de potassium sur la vitesse de consommation d' $O_2$  de la pâte pétrie au sitoxygraphe.

## Résultats et Discussions

---

au surpétrissage et aux fermentations longues, tandis que l'ADA peut être utilisé en remplacement de l'iodate de potassium (oxydant rapide).

En premier lieu, l'ADA a été ajouté à la dose de 30 ppm ( $0,3 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ), aucun effet sur la courbe de consommation d' $\text{O}_2$  n'a été observé (résultat non montré). Le bromate de potassium a été ajouté à la dose de 125 ppm ( $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) et 375 ppm ( $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). Louarme (2001) rapporte qu'entre 40 et 160 ppm de bromate ajouté à la pâte pétrie au bioréacteur, aucune modification de la consommation d' $\text{O}_2$  n'est observée. Il précise également que le bromate n'influence pas l'activité LOX en milieu aqueux à la dose de 1 mM. Au sitoxygraphe, dès la dose de  $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , la consommation est plus importante que la consommation témoin (figure 118). L'effet du bromate sur la consommation d' $\text{O}_2$  semble être dose dépendant avant 12 min de pétrissage. Après 12 min, la courbe d' $\text{O}_2$  de la pâte additionnée de  $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  de bromate maintient une consommation forte, tandis que la pâte additionnée de  $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  se rapproche de la courbe témoin. L'examen des vitesses instantanées de consommation d' $\text{O}_2$  montre que seules les vitesses instantanées de consommation initiales ( $t < 5 \text{ min}$ ) et intermédiaires (entre 9 et 15 min) sont légèrement supérieures à celles du témoin pour la pâte contenant  $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ . De façon différente, la pâte supplémentée avec  $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  présente des  $V_i\text{O}_2$  nettement supérieures à la courbe témoin jusqu'à 5 min de pétrissage (avec un écart de  $0,05 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-1}$ ) puis deviennent inférieures au-delà (figure 119). Si on compare l'évolution des vitesses instantanées de consommation de ces différentes pâtes en fonction de la quantité d' $\text{O}_2$  consommée au cours du pétrissage, on voit que quand la quantité d' $\text{O}_2$  consommée est inférieure à  $1,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , la pâte qui contient  $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  de bromate a des vitesses instantanées de consommation légèrement inférieures au témoin tandis que la pâte contenant  $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  est strictement identique au témoin (figure 120). Pour les pâtes supplémentées en bromate, l'apparition de la vitesse maximale de consommation est décalée vers une quantité d' $\text{O}_2$  consommée plus grande (environ  $0,15 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ), puis les vitesses sont maintenues fortes au fur et à mesure du pétrissage (et de la consommation d' $\text{O}_2$ ), jusqu'à la fin du pétrissage pour la dose de  $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , tandis qu'après  $3,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d' $\text{O}_2$  consommé les vitesses instantanées de consommation d' $\text{O}_2$  de la pâte contenant  $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  chutent rapidement et deviennent inférieures au témoin après  $4,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d' $\text{O}_2$  consommé.

En résumé, le bromate de potassium accélère les phénomènes d'oxydation (traduits par la consommation d' $\text{O}_2$ ) en diminuant le temps d'apparition du  $\text{VO}_{2\text{MAX}}$  de façon proportionnelle et en augmentant la quantité d' $\text{O}_2$  consommée au  $\text{VO}_{2\text{MAX}}$  sans modifier la valeur de cette dernière (tableau 50). L'addition de bromate ne modifie pratiquement pas



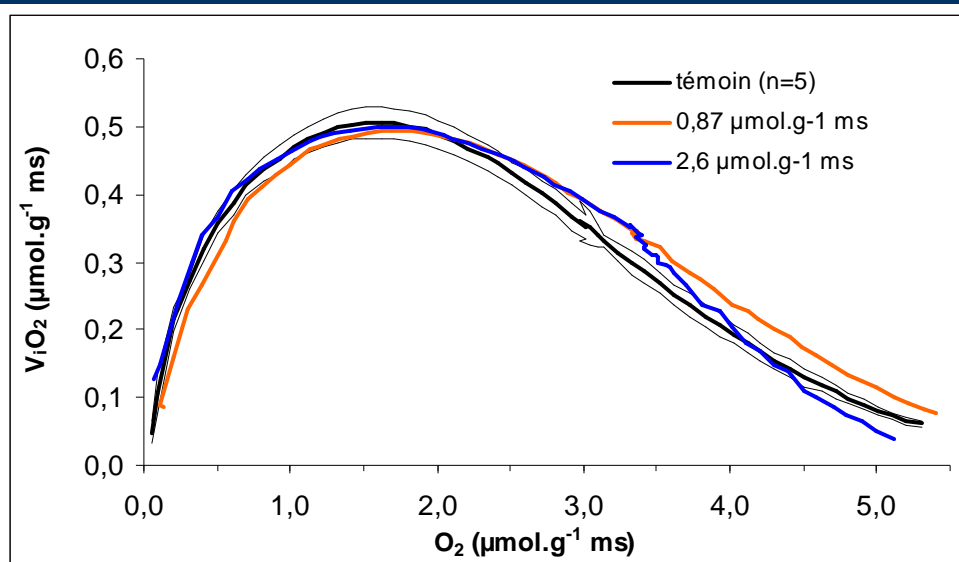


Figure 120. Effet de l'addition de deux doses de bromate de potassium sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> exprimée en fonction de l'oxygène consommé de la pâte pétrie au sitoxygraphe.

Tableau 50. Effets de l'ajout de 2 doses de bromate de potassium sur les paramètres extraits de la courbe  $V_{O_2} = f(O_2)$ .  $V_{O_2\text{MAX}}$  exprimée en  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $t_{VO_2\text{MAX}}$  exprimée en min,  $O_{2VO_2\text{MAX}}$  exprimée en  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$ .  $\text{Stab}_{t_0}$  : critères de stabilité correspondant d'une part au laps de temps depuis le début du pétrissage (en min) pendant lequel  $V_{iO_2} \geq 0,8 \cdot V_{O_2\text{MAX}}$  et d'autre part la quantité d'O<sub>2</sub> consommée pendant ce laps de temps ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$ ).

|  | $V_{O_2\text{MAX}}$<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}\cdot\text{min}^{-1}$ ) | $t_{VO_2\text{MAX}}$<br>(min) | $O_{2VO_2\text{MAX}}$<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$ ) | $\text{Stab}_{t_0}$<br>(min) | $\text{Stab}_{t_0O_2}$<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$ ) |
|--|--|-------------------------------|--|------------------------------|---|
| Témoin (n=4)   | 0,506  | 5,87                          | 1,55   | 8,27                         | 2,66  |
| ET   | 0,02   | 0,07                          | 0,04   | 0,19                         | 0,12  |
| KBrO <sub>3</sub> 0,86 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$ | 0,494  | 5,63                          | 1,69   | 8,38                         | 2,89  |
| ET   | nd   | nd                            | nd   | nd                           | nd  |
| KBrO <sub>3</sub> 2,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{ms}$  | 0,500  | 5,22                          | 1,68   | 7,93                         | 2,91  |
| ET   | nd   | nd                            | nd   | nd                           | nd  |

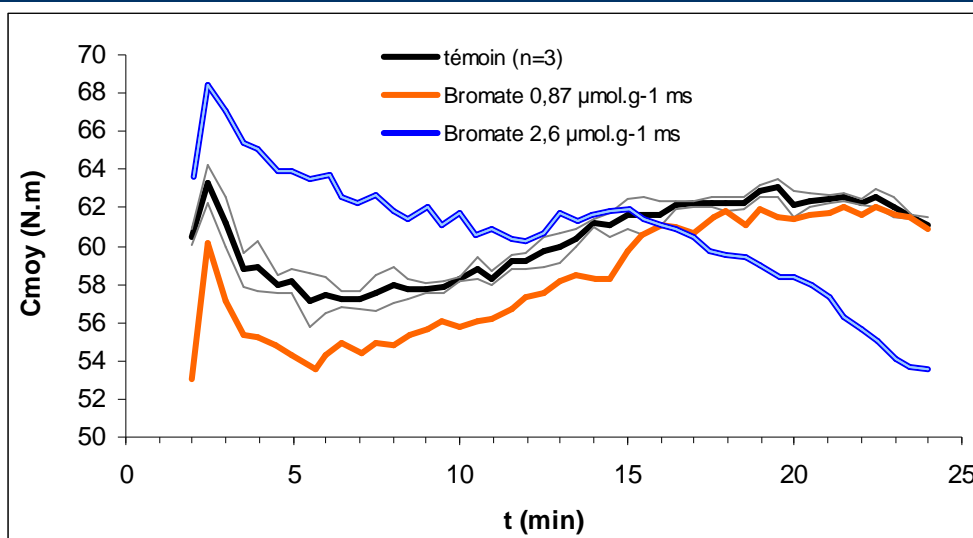


Figure 121. Effet de l'ajout de deux doses de bromate de potassium (0,87 et 2,6  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur l'évolution du couple pendant le pétrissage

Tableau 51. Effet de l'ajout de bromate de potassium sur les paramètres extraits de la courbe de couple moyen

|                           | CM1 <sub>moy</sub> | tM1 <sub>moy</sub> | St1 <sub>moy</sub> | Cm1 <sub>moy</sub> | tm1 <sub>moy</sub> | Af1 <sub>moy</sub> | tA1 <sub>moy</sub> | CM2 <sub>moy</sub> | tM2 <sub>moy</sub> | St2 <sub>moy</sub> | Cm2 <sub>moy</sub> | tm2 <sub>moy</sub> | Af2 <sub>moy</sub> |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Témoin n=3</b>         | <b>63,9</b>        | <b>2,5</b>         | <b>0,5</b>         | <b>56,4</b>        | <b>5,5</b>         | <b>7,6</b>         | <b>3,1</b>         | <b>63,5</b>        | <b>20,3</b>        | <b>11,1</b>        | <b>61,0</b>        | <b>24,1</b>        | <b>2,5</b>         |
| <i>ET</i>                 | 0,7                | 0,1                | 0,1                | 0,7                | 1,3                | 0,7                | 1,4                | 0,3                | 1,6                | 0,5                | 0,4                | 0,3                | 0,2                |
| KBrO <sub>3</sub> 125 ppm | 60,4               | 2,4                | 0,4                | 53,6               | 5,9                | 6,8                | 3,5                | 62,4               | 22,3               | 9,7                | 60,9               | 24,0               | 1,5                |
| KBrO <sub>3</sub> 375 ppm | 68,7               | 2,4                | 1,2                | 60,3               | 12,0               | 8,5                | 9,5                | 62,0               | 15,0               | nc                 | 53,0               | 24,3               | 9,0                |

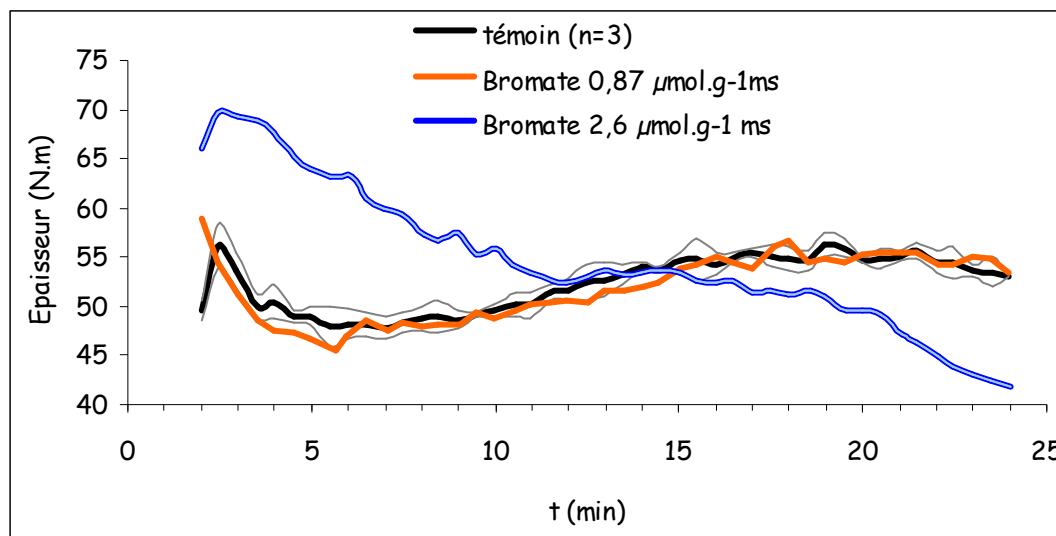


Figure 122. Effet de l'ajout de deux doses de bromate de potassium (0,87 et 2,6  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ ) sur l'évolution du couple pendant le pétrissage

Tableau 52. Effet de l'ajout de bromate de potassium sur les paramètres extraits de la courbe d'épaisseur de la courbe.

|                           | CM1 <sub>ep</sub> | tM1 <sub>ep</sub> | St1 <sub>ep</sub> | Cm1 <sub>ep</sub> | tm1 <sub>ep</sub> | Af1 <sub>ep</sub> | tA1 <sub>ep</sub> | CM2 <sub>ep</sub> | tM2 <sub>ep</sub> | St2 <sub>ep</sub> | Cm2 <sub>ep</sub> | tm2 <sub>ep</sub> | Af2 <sub>ep</sub> | durée AFF  |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| <b>Témoin n=3</b>         | <b>56,9</b>       | <b>2,5</b>        | <b>0,3</b>        | <b>46,9</b>       | <b>6,1</b>        | <b>10,0</b>       | <b>3,6</b>        | <b>56,7</b>       | <b>19,2</b>       | <b>8,8</b>        | <b>52,4</b>       | <b>23,7</b>       | <b>4,3</b>        | <b>4,5</b> |
| <b>ET</b>                 | <b>2,0</b>        | <b>0,1</b>        | <b>0,1</b>        | <b>1,4</b>        | <b>2,3</b>        | <b>0,7</b>        | <b>2,3</b>        | <b>1,1</b>        | <b>0,1</b>        | <b>1,7</b>        | <b>0,7</b>        | <b>0,3</b>        | <b>0,4</b>        | <b>0,4</b> |
| KBrO <sub>3</sub> 125 ppm | 54,6              | 2,4               | 0,4               | 45,4              | 5,3               | 9,2               | 2,9               | 57,1              | 17,8              | 7,2               | 53,4              | 24,0              | 3,7               | 6,2        |
| KBrO <sub>3</sub> 375 ppm | 69,9              | 2,4               | 1,8               | 52,4              | 12,0              | 17,4              | 9,6               | 53,6              | 15,4              | nc                | 41,4              | 25,0              | 12,3              | 9,6        |

## Résultats et Discussions

---

l'instant où la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> devient inférieure à 80 % de la VO<sub>2MAX</sub>, mais augmente la quantité d'O<sub>2</sub> consommée pendant cette période.

Ces résultats sont surprenants car les réactions chimiques impliquant le bromate dans la pâte décrites dans la littérature ne font pas intervenir directement l'O<sub>2</sub>. Cependant, les thiols oxydés par le bromate peuvent intervenir dans les réactions impliquant l'O<sub>2</sub> diminuant du même coup la compétition vis-à-vis de l'utilisation de ce dernier.

Le fait d'ajouter du bromate de potassium dans la pâte provoque de nets effets sur les valeurs du couple moyen pendant le pétrissage (figure 121). En fonction de la dose ajoutée, la nature des effets est différente. A la dose de 125 ppm (0,87 μmol.g<sup>-1</sup> ms), l'effet principal est un léger affaiblissement des valeurs de couple. En effet, les valeurs maximales (CM1) et minimales (Cm1) de couple sont diminuées de 5 % par rapport au témoin (tableau 51) alors que le second pic de consistance (CM2) est identique pour la pâte témoin et la pâte supplémentée en bromate (0,87 μmol.g<sup>-1</sup> ms). Dans le cas de cette dernière, ce second pic est légèrement décalé (environ 2 min) vers les temps plus importants (tableau 51). A cette dose, on obtient donc un effet affaiblissant global qui toutefois s'atténue en fin de pétrissage.

Au contraire, lorsqu'on ajoute un excès de bromate (2,6 μmol.g<sup>-1</sup> ms), l'allure de la courbe de couple (figure 121) est totalement différente, puisque les valeurs de couple sont supérieures à celles du témoin jusqu'à 15 min. De plus, même si vers 15 min une légère augmentation (reprise) des valeurs de couple est observée, le couple diminue de façon régulière au-delà. Dès lors, les paramètres déterminés sont totalement différents du témoin (tableau 51), augmentation de 7,6 % du premier pic de consistance (CM1 = 68,7 N.m au lieu de 63,9 N.m), stabilité initiale plus longue (St1 = 1,2 min au lieu de 0,5 min), affaiblissement plus important (Af1 = 8,5 N.m contre 7,6 N.m) et durée plus longue de cet affaiblissement (tA1 = 9,5 min au lieu de 3,1 min), très légère reprise de consistance dans seconde période de pétrissage (CM2 – Cm1 = 1,7 N.m au lieu de 7,1 N.m) et fort affaiblissement des valeurs de couple (Af2 = 9 N.m au lieu de 2,5 N.m).

En outre, l'examen de l'épaisseur de la courbe de couple ne montre aucune différence entre la pâte témoin et celle contenant 0,87 μmol.g<sup>-1</sup> ms puisque les deux courbes sont superposées (figure 122). En revanche, les différences sont nettes entre le témoin et l'essai réalisé en présence de 2,6 μmol.g<sup>-1</sup> ms de bromate et encore accentuées par rapport à celles observées sur le couple moyen. La comparaison des tableaux 51 (couple moyen) et 52 (épaisseur) montre par exemple que les ratios bromate / témoin passent de :

- 1,08 à 1,23 pour CM1 ;
- 2,4 à 6 pour St1 ;

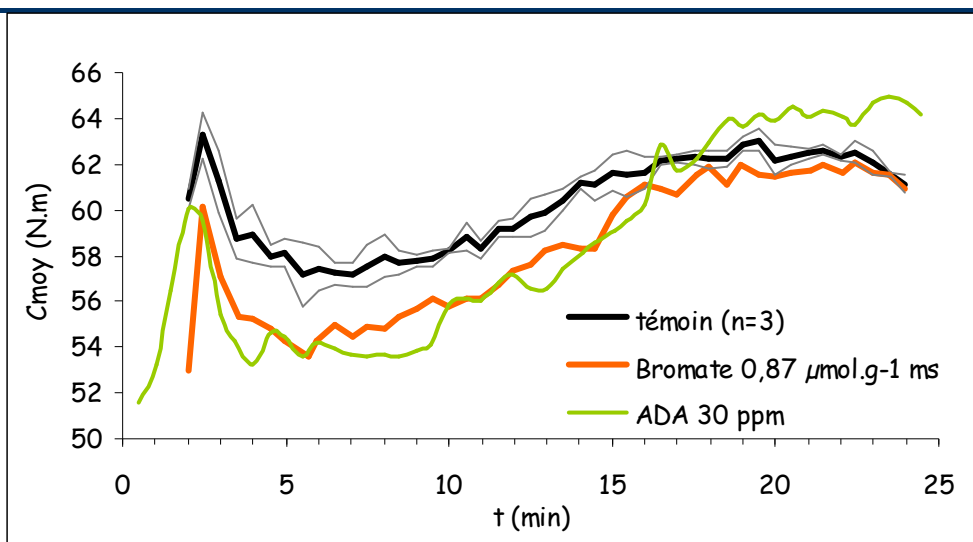


Figure 123. Effet de l'ajout de 30 ppm d'azodicarbonamide (ADA) sur l'évolution du couple pendant le pétrissage.

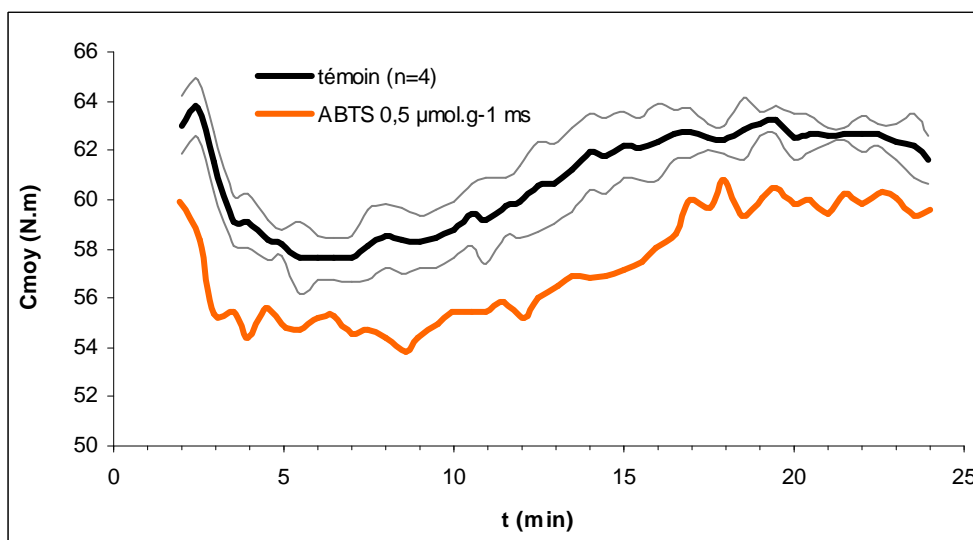


Figure 124. Effet de l'ajout d'ABTS ( $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage.

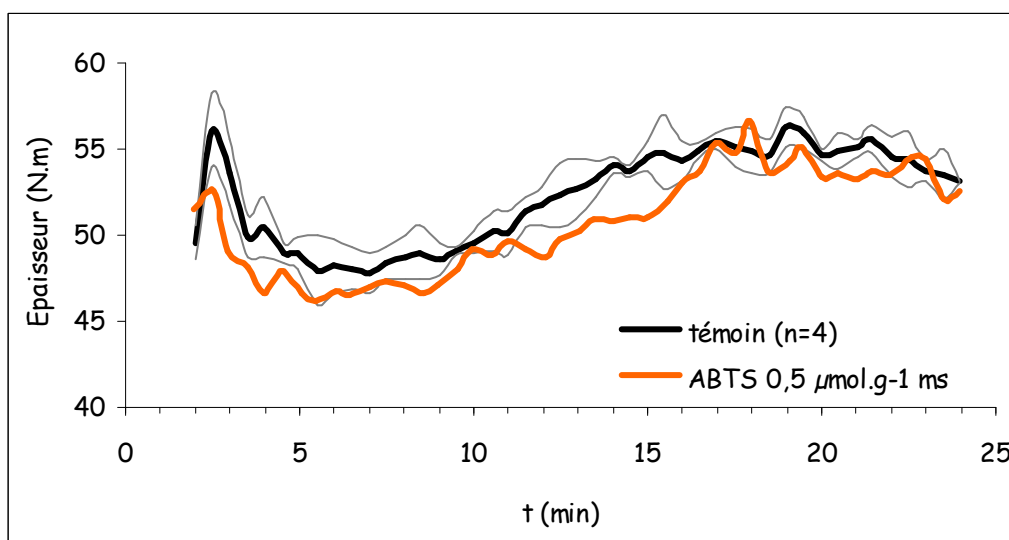


Figure 125. Effet de l'ajout d'ABTS ( $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage.

- 1,12 à 1,74 pour Af1 ;
- 3,6 à 2,86 pour Af2 ;
- 5,4 à 6,3 pour l'affaiblissement total (CM1 – Cm2).

Ce dernier résultat souligne l'intérêt de conserver les données sur les paramètres d'épaisseur de couple.

L'effet de l'ADA ( $0,3 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur le couple moyen (figure 123) est similaire à l'effet du bromate (dose de  $0,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ), les valeurs des pics de consistance et du couple minimum sont identiques et diminuées de 5 % par rapport au témoin. En revanche, l'effet de l'ADA 30 ppm est différent vers la fin du pétrissage. Il entraîne une augmentation du couple après 10 min de pétrissage pour atteindre des valeurs supérieures au premier pic de consistance vers 15 min (60 N.m). Le couple atteint après 24 min représente une augmentation de 8,4 %, les valeurs de couple restent stables autour de cette valeur (65,3 N.m) en fin de pétrissage.

### 4.4.1.4 Ajout de l' ABTS

Dans la suite du travail, nous avons entrepris d'étudier le mécanisme d'action de la laccase au sein de la pâte pendant le pétrissage. Les laccases sont peu spécifiques, et ont donc un large spectre de substrats redox potentiels dans la pâte tels que les acides cinnamiques ou d'autres composés phénoliques comme la tyrosine. Cette enzyme est également utilisée pour oxyder des composés difficilement oxydables en utilisant des médiateurs d'oxydation. Etant un très bon substrat, l'ABTS est potentiellement un médiateur modèle intéressant.

Nous avons donc mesuré l'effet de ce composé ajouté seul dans la pâte au cours du pétrissage. Aux doses de 0,5 et  $1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'ABTS ajoutés, nous n'observons pas de différences entre les courbes de consommation d' $\text{O}_2$  des pâtes supplémentées et la courbe témoin (résultats non montrés).

Nous avons examiné l'effet de l'ABTS ajouté seul dans la pâte sur la mesure du couple au cours du pétrissage. L'ajout d'ABTS, à la dose de  $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , conduit à une diminution systématique du couple moyen (figure 124) alors qu'il est sans effet notable sur l'épaisseur de couple (figure 125).

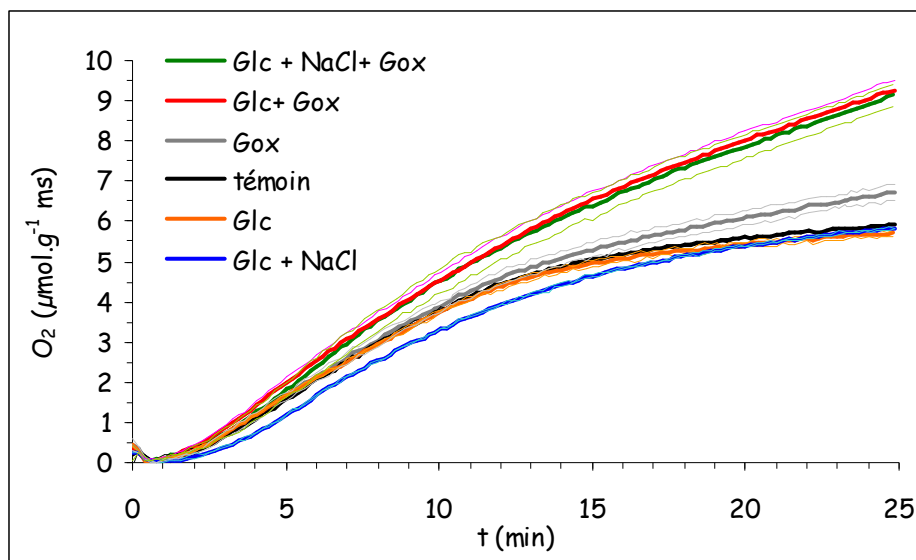


Figure 126. Courbes de consommation d'oxygène mesurée au sitoxygraphe pour des pâtes non levurées additionnées de glucose oxydase (GOX, 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms), de glucose (Glc, 40 g) et de NaCl (1,8 %) pour des pâtes de 4 kg (55 g d'eau.100 g<sup>-1</sup> farine).

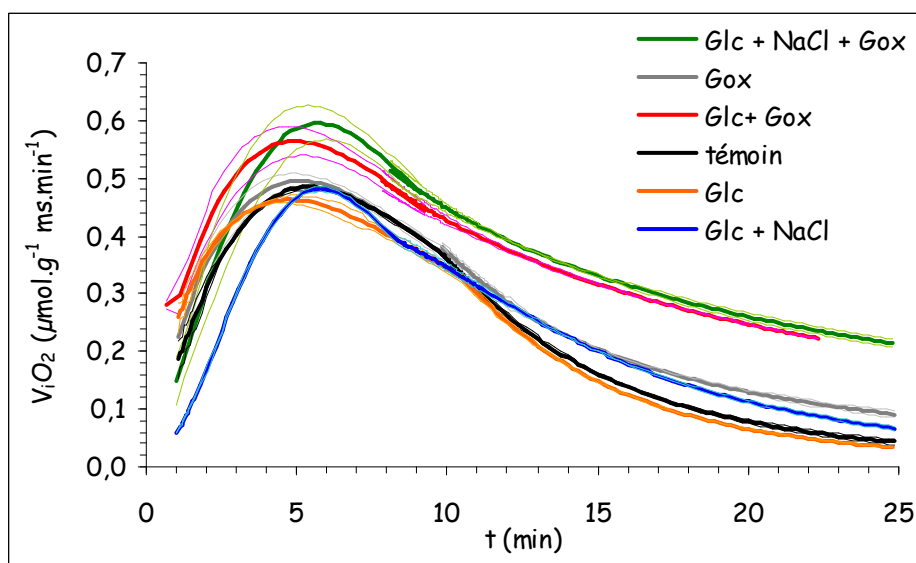


Figure 127. Cinétique de consommation d'oxygène mesurée au sitoxygraphe pour des pâtes non levurées additionnées de glucose oxydase (GOX, 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms), de glucose (Glc, 40 g) et de NaCl (1,8 %) pour des pâtes de 4 kg (55 g d'eau.100 g<sup>-1</sup> farine).

## 4.4.2 Effet d'oxydoréductases sur les paramètres mesurés au sitoxygraphe

### 4.4.2.1 Effet de la glucose oxydase

#### 4.4.2.1.1 Sur la consommation d'O<sub>2</sub>

La glucose oxydase est une enzyme intéressante pour ses effets améliorants sur les pâtes souvent préconisées dans les formulations (Vemulapalli et Hosoney, 1998 ; Rasiah *et al.*, 2005 ; Bonet *et al.*, 2006 ; Hanft et Koehler, 2006).

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de l'ajout de GOX dans des pâtes dont la base est composée de farine Corde Noire spéciale et d'eau. La masse de pâte est maintenue constante à 4 kg. A 100 g de farine et 55 mL d'eau sont ajoutés (ou non) 0,43  $\mu$ kat d'activité GOX (Lyven), 1,54 g de glucose et 1,8 g de NaCl. La figure 126 présente les courbes de consommation d'O<sub>2</sub> obtenues.

En premier lieu, en absence de GOX, l'ajout de glucose provoque une légère surconsommation d'oxygène au début du pétrissage et une faible sous consommation en fin de pétrissage. Il est possible que suite à l'ajout de glucose, une modification de la disponibilité de l'eau affecte les systèmes enzymatiques responsables de la consommation d'oxygène. L'ajout simultané de chlorure de sodium conduit à une nette diminution de la consommation d'oxygène en début de pétrissage mais avec un ralentissement moins prononcé dans la seconde phase du pétrissage. Ainsi, la figure 127 montre qu'en présence de chlorure de sodium, la vitesse est fortement ralentie pendant les 5 premières min du pétrissage puis passe en-dessus du témoin (avec ou sans glucose) au-delà de 10 min. L'effet inhibiteur du NaCl sur le système LOX est probablement responsable des vitesses initiales plus faibles (Nicolas et Potus, 1994). Moins active en début de pétrissage, la LOX peut poursuivre son action en fin de pétrissage. Ces résultats soulignent l'importance de la formulation sur les phénomènes oxydatifs à l'origine de la consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte.

Lorsqu'on ajoute de la GOX sans glucose, une surconsommation d'O<sub>2</sub> finale d'environ 1  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> ms est observée. Selon Potus *et al.* (1994) la teneur en glucose libre dans la farine est proche de 0,3 mg.g<sup>-1</sup> ms (environ 1,6  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> ms ou encore 1,88 mM dans la phase aqueuse de la pâte). Après 15 min de pétrissage en absence de levure, cette teneur passe à 1,7 mg.g<sup>-1</sup> ms (environ 9,4  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> ms ou encore 10,6 mM dans la phase aqueuse). Nos résultats montrent donc que tout le glucose initialement présent dans la farine (et *a fortiori*



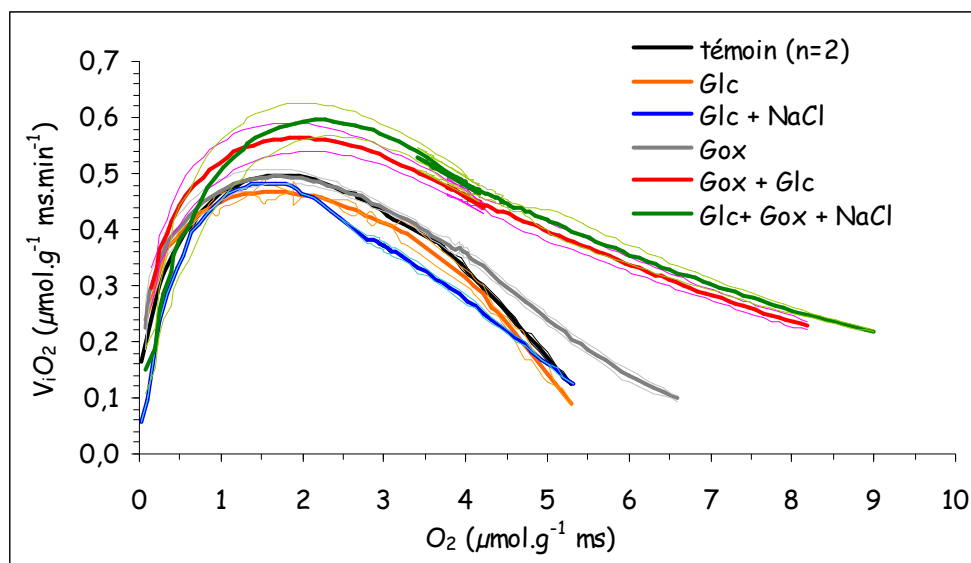


Figure 128. Cinétique de consommation d'oxygène mesurée au sitoxygraphe et exprimée en fonction de la quantité d' $O_2$  consommée pour des pâtes additionnées de glucose oxydase (GOX, 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms), de glucose (Glc, 40 g), et de NaCl (1,8 %) pour des pâtes de 4 kg (55 g d'eau.100 g<sup>-1</sup> farine).

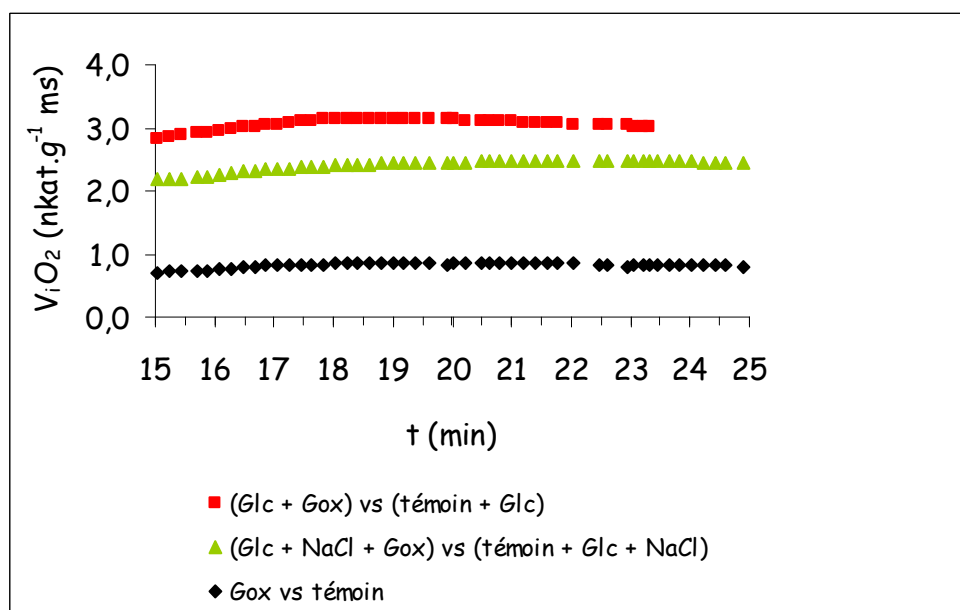


Figure 129. Représentation de l'attribution de la vitesse de consommation à la GOX en fin de pétrissage Evolution de la différence entre la vitesse de consommation d' $O_2$  exprimée en kat.g<sup>-1</sup> ms avec ou sans Gox, pour des pâtes formées de farine et d'eau, de glucose ou non et de NaCl ou non

celui formé pendant le pétrissage) n'est pas consommé par la GOX. Cette observation peut s'expliquer par les conditions dans lesquelles se déroule la réaction enzymatique catalysée par la GOX. En effet, les constantes d'affinités (assimilées au  $K_m$ ) de la GOX sont respectivement de 0,48 mM vis-à-vis de l' $O_2$  en milieu saturé en glucose et de 22 mM vis-à-vis du glucose (Garcia, 2000). Ainsi, au début du pétrissage, les concentrations des substrats sont voisines de 0,25  $K_m$  pour l' $O_2$  (et voisine du  $K_m$  en fin de pétrissage, avec en outre une compétition vis-à-vis du système LOX) et inférieures à 0,1  $K_m$  pour le glucose ( $< 0,6 K_m$  en fin de pétrissage). D'après les vitesses instantanées (figure 127), la GOX ne fonctionne que faiblement au début du pétrissage alors qu'elle est plus active dans la seconde partie. Il est probable que les systèmes endogènes (le système LOX-PUFA- $O_2$  notamment) fonctionnent majoritairement en début de pétrissage puis deviennent moins actifs après 10 min de pétrissage, la glucose oxydase prenant ensuite le relais (vitesses instantanées de consommation forte en fin de pétrissage (figure 127)), puisque la compétition sur l' $O_2$  est moindre avec les systèmes enzymatiques endogènes.

Par ailleurs, l'ajout simultané de glucose à une pâte supplémentée en GOX (avec ou sans NaCl) provoque une nette surconsommation d'oxygène tout au long du pétrissage (figure 126). Celle-ci est de 4  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms après 25 min de pétrissage. L'ajout de 1,54 g de glucose pour 100 g de farine humide conduit à une augmentation de la concentration en glucose libre de 100  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms ou encore 120 mM dans la phase aqueuse de la pâte. Dès lors, la GOX se trouve en présence d'une concentration en glucose supérieure à 5  $K_m$  et donc dans des conditions nettement plus favorables à l'expression de son activité.

L'examen des vitesses en fonction des quantités d'oxygène consommée (figure 128) montre pour le témoin une cassure vers 4  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms. Celle-ci pourrait être expliquée par la consommation quasi-totale des PUFA oxydables présents dans la farine utilisée par le système LOX (figure 99). Cette cassure également observée en présence de glucose (moins nettement), ne l'est plus en présence de NaCl. Dans ce dernier cas, il est possible que le NaCl, en ralentissant l'activité LOX au début du pétrissage, protège cette activité d'une dénaturation rapide. En présence de GOX, aucune cassure n'est observée puisque le système GOX-glucose est toujours fonctionnel en raison du large excès de glucose par rapport à l'oxygène disponible.

L'examen des vitesses en fonction du temps de pétrissage (figure 127) montre que dès les 5 premières min de pétrissage, les vitesses en présence de GOX sont systématiquement supérieures à celles des pâtes équivalentes sans GOX avec un surplus maximum de vitesse de 0,1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms.min<sup>-1</sup>. Au-delà de 10 min, cet écart s'accroît d'autant plus nettement que l'on

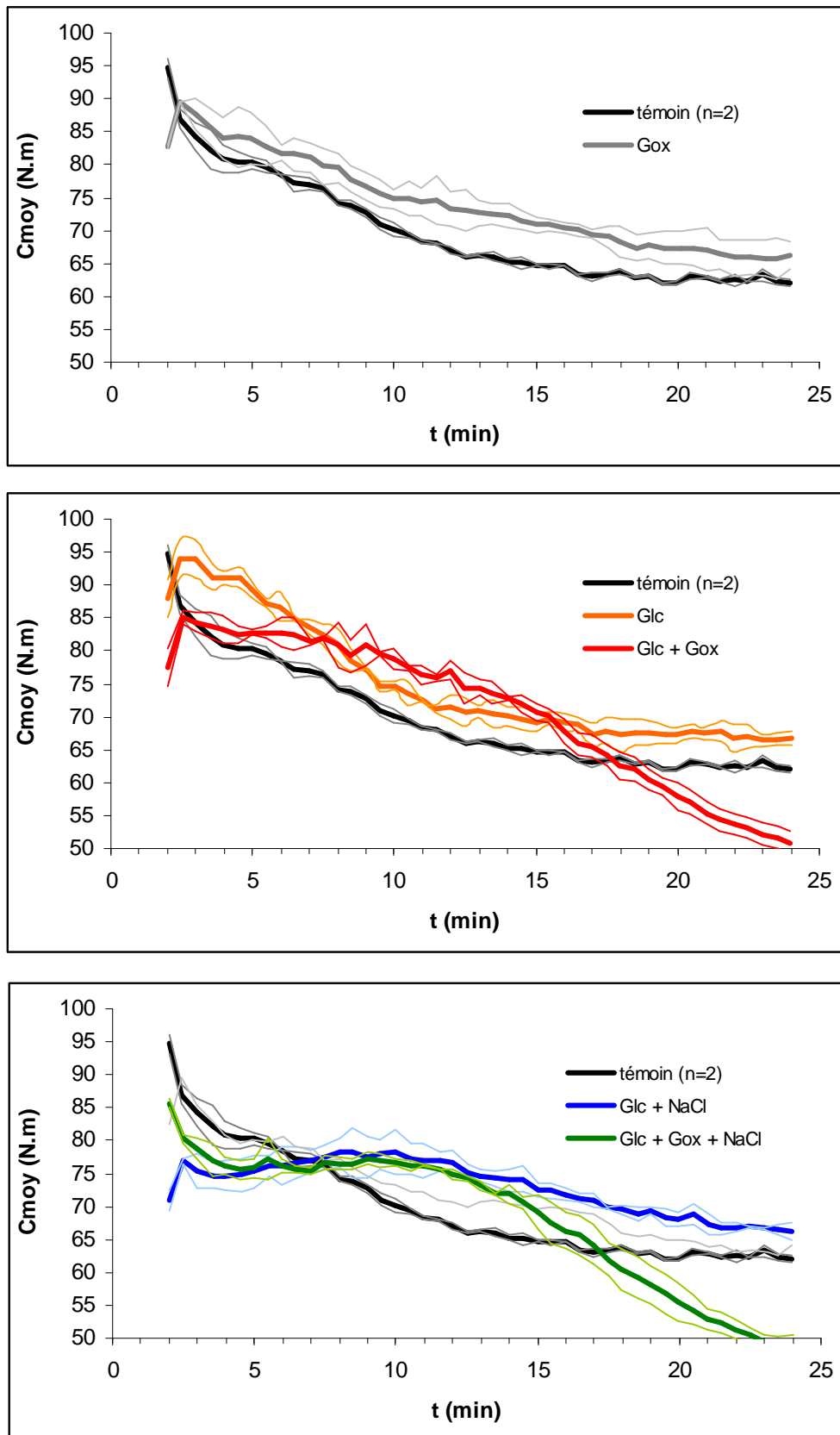


Figure 130. Effet de l'ajout de Glucose oxydase (Gox,  $5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage (en présence de glucose (Glc) et de glucose et de NaCl (Glc + NaCl))

passer d'une pâte GOX seule, à une pâte avec GOX + glucose + chlorure de sodium et enfin à une pâte GOX + glucose (figure 127).

Dans ce dernier cas (pâte GOX + glucose), en fin de pétrissage et en considérant que l'apport d'O<sub>2</sub> est constant au sein de la pâte, que la quantité de glucose disponible est en large excès et que les autres systèmes enzymatiques sont peu actifs, soit parce que les substrats redox sont quasiment épuisés et/ou que les enzymes sont largement dénaturées (confirmé par les vitesses instantanées de consommation faibles en fin de pétrissage pour la pâte témoin), on peut émettre l'hypothèse que la vitesse de consommation finale est uniquement due à l'action de la GOX. De plus, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé lors de la réaction de transformation du glucose en acide gluconique est fortement inhibiteur de la LOX (Valtorta, 2000). La figure 129 montre la différence entre les vitesses instantanées de consommation à chaque instant entre une pâte contenant et ne contenant pas de GOX (pour attribuer une vitesse de consommation à la GOX seule). Pour chaque pâte (témoin, glucose, glucose et NaCl), le surplus de vitesse de consommation tend vers une valeur constante, respectivement 0,045, 0,18 et 0,14 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup> soit 0,75, 3 et 2,25 nkat.g<sup>-1</sup> ms. Au maximum, 3 nkat.g<sup>-1</sup> ms peuvent donc être attribués à l'action de la GOX à comparer aux 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms incorporé à la farine. Ceci correspond à une diminution d'activité voisine de 40 % ce qui confirme les résultats obtenus par Rakotozafy *et al.* (1999) et Garcia (2000) qui ont observé une diminution de 30 % de l'activité GOX extractible après 20 min de pétrissage au consistographe<sup>®</sup>.

### 4.4.2.1.2 Sur les paramètres de couple

Dans toutes les pâtes étudiées composées soit à partir de farine et d'eau, soit à partir de farine, d'eau et de glucose, soit à partir de farine, d'eau, de glucose et de NaCl, nous avons étudié l'effet de l'addition de 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms d'activité GOX. Sur le couple moyen, l'ajout de GOX renforce la résistance moyenne de la pâte au passage du bras pendant le pétrissage (figure 130). Plus précisément, l'ajout de GOX à la pâte témoin (composée uniquement de farine et d'eau) augmente les valeurs de couple (environ 5 N.m) pendant le pétrissage, de façon plutôt constante (figure 130.A). Entre 0 et 8 min, l'écart par rapport à la courbe moyenne témoin est à la limite de la significativité. Les données de couple viennent ici compléter les données d'O<sub>2</sub>. En effet, bien que peu active (effet à peine visible sur la consommation d'O<sub>2</sub> (figure 126) en début de pétrissage), des différences dues à la présence de GOX sont observées sur les données rhéologiques dès 8 min. Après 10 min, l'effet est accentué. On observe un raffermissement plus important de près de 7,5 N.m vers 15 min par rapport à la courbe moyenne témoin.

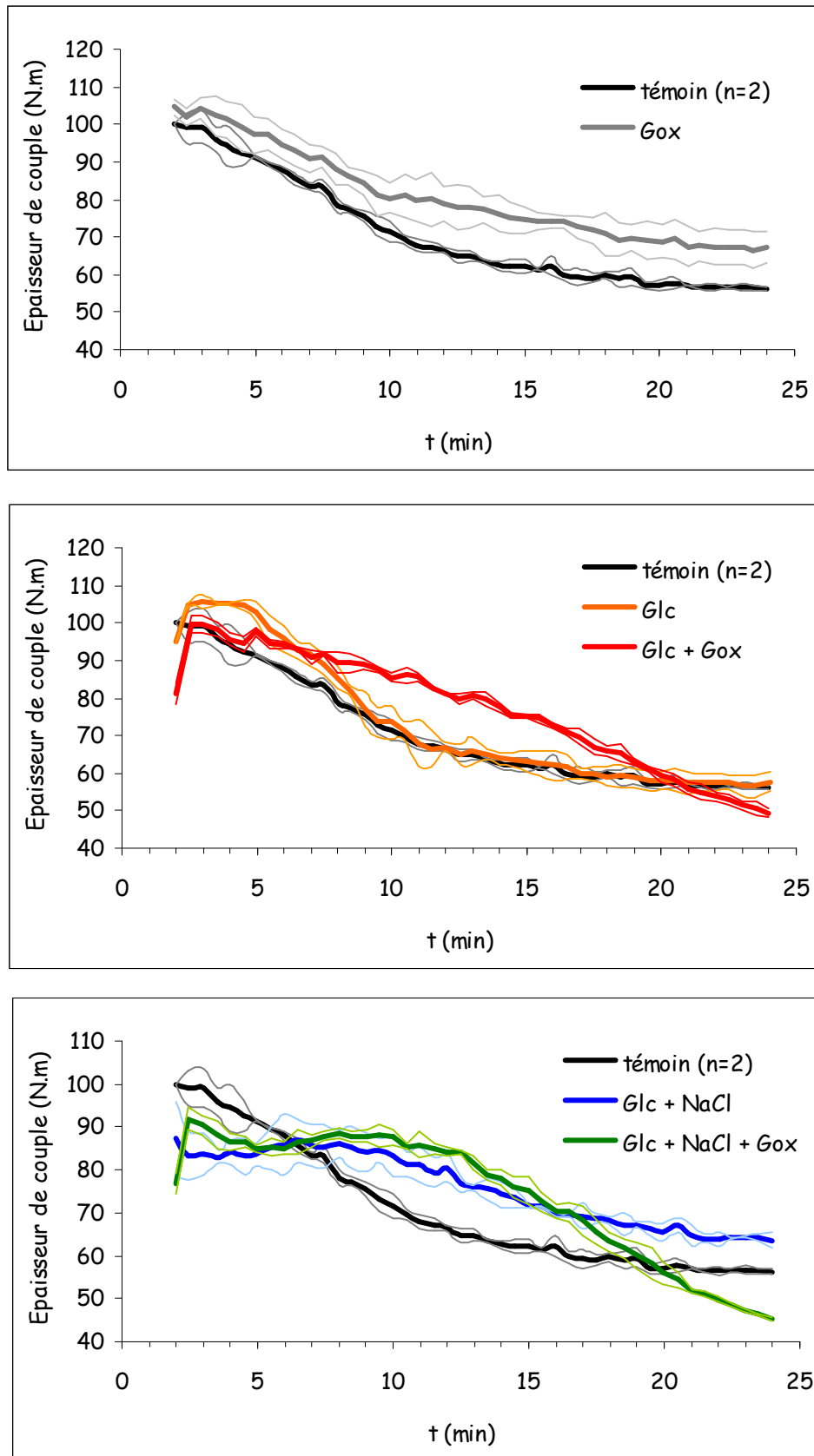


Figure 131. Effet de l'ajout de Glucose oxydase (Gox, 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage (en présence de glucose (Glc) et de glucose et de NaCl (Glc + NaCl))

## Résultats et Discussions

---

En présence de glucose et GOX (figure 130.B), le raffermissement observé par rapport au témoin est plus important entre 10 et 15 min (écart d'environ 10 N.m), tandis qu'en fin de pétrissage vers 25 min, les valeurs de couple moyen diminuent fortement en devenant inférieures à 50 N.m. En présence de GOX et d'un excès de glucose (40 g) avec ou sans NaCl, les pâtes sont peu tolérantes au surpétrissage. Nous avons noté que ces pâtes sont totalement déstructurées, en sortie de pétrin, granuleuses et inconsistantes. Par ailleurs, il est important de noter l'effet du glucose seul ajouté à la pâte. Celui-ci (en absence de sel) provoque un pic de consistance moyen initial semblable à celui du témoin (95 N.m), ralentit l'affaiblissement des valeurs de couple et maintient des valeurs supérieures d'environ 5 N.m par rapport à la pâte témoin. Ces deux derniers effets sont également observés en présence de NaCl (figure 130.C). Il est possible que l'ajout de glucose modifie la répartition de l'eau au sein de la pâte et mime un effet de sous hydratation. En présence de GOX (figure 130.B), il est peu envisageable que la quantité de glucose consommée modifie la répartition d'eau entre les constituants de la pâte et il est possible que ce soit la production d' $H_2O_2$  qui soit responsable des effets rhéologiques constatés (déstructurants entre 0 et 7 min, structurants entre 7 et 16 min et déstructurants au-delà). Lorsque du NaCl est ajouté, seuls les effets déstructurants apparaissent au-delà de 14 min de pétrissage (figure 130.C).

Cette observation souligne l'importance du NaCl sur la consistance des pâtes. Le sitoxygraphe fait apparaître des différences importantes sur les mesures de couple et l'effet du NaCl (modification de la force ionique, modification des propriétés des protéines) semble pouvoir être étudié et caractérisé de manière plus fine avec cet appareil.

L'examen de l'effet de l'ajout de GOX dans les pâte étudiées sur l'évolution de l'épaisseur du couple pendant le pétrissage conduit globalement aux mêmes remarques que celles faites ci-dessus, c'est-à-dire l'effet raffermissant lors de l'ajout de GOX et en présence de glucose déstructuration de la pâte en fin de pétrissage. En revanche, l'effet raffermissant est accentué en milieu de pétrissage en présence de GOX (figure 131. B et C ) tandis que les effets des ingrédients sont moins soulignés. La comparaison des courbes de couple moyen et d'épaisseur (figure 131.B) montre que le glucose a un effet constant sur le couple moyen (+ 10 N.m) tout au long du pétrissage alors que l'écart disparaît sur l'épaisseur au-delà de 10 min de pétrissage (effet possible sur la répartition de l'eau dans la pâte). L'ajout simultané de GOX donne une allure similaire pour les deux courbes avec un effet structurant (par rapport au témoin) jusqu'à 17 min de pétrissage (effet possible de la production d' $H_2O_2$ ).

Par la suite, nous avons caractérisé les effets observés sur les paramètres décrits dans les chapitres précédents extraits des courbes d'épaisseur de couple. La synthèse des résultats est

## Résultats et Discussions

Tableau 53. Synthèse de résultats : effet de l'ajout de Glucose oxydase (GOX, 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms) sur les paramètres extraits de la courbe d'épaisseur de couple pendant le pétrissage (en présence de glucose (Glc) et de glucose et de NaCl (Glc + NaCl)).

|                       | CM1<br>(N.m) | tM1<br>(min) | St1<br>(min) | Cm1<br>(N.m) | tm1<br>(min) | Af1<br>(N.m) | TAf<br>(min) |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Témoin<br/>n=2</b> | 99,4         | 2,6          | 1,3          | 55,6         | 22,9         | 43,8         | 20,4         |
| ET                    | 4,1          | 0,2          | 0,2          | 0,9          | 1,2          | 3,2          | 0,9          |
| Glc                   | 108,9        | 2,7          | 2,1          | 56,1         | 23,4         | 52,8         | 20,7         |
| ET                    | 1,4          | 0,5          | 0,0          | 2,9          | 0,2          | 4,3          | 0,3          |
| Glc +<br>NaCl         | 88,0         | 6,9          | 2,7          | 62,6         | 22,2         | 25,5         | 15,3         |
| ET                    | 4,6          | 1,7          | 1,4          | 1,4          | 0,1          | 3,2          | 1,8          |
| GOX                   | 104,9        | 3,0          | 1,5          | 66,1         | 24,0         | 38,8         | 20,9         |
| ET                    | 2,5          | 0,3          | 0,4          | 4,3          | 0,6          | 1,8          | 0,3          |
| Glc +<br>GOX          | 100,1        | 3,9          | 2,1          | 47,9         | 24,3         | 52,2         | 20,4         |
| ET                    | 2,3          | 1,5          | 0,3          | 2,6          | 0,2          | 0,3          | 1,3          |
| Glc +<br>NaCl + GOX   | 92,3         | 2,6          | 8,2          | 45,0         | 24,1         | 47,3         | 21,5         |
| ET                    | 3,0          | 0,2          | 1,3          | 0,0          | 0,1          | 3,0          | 0,1          |

## Résultats et Discussions

---

dans le tableau 53. L'allure des courbes (pâte hydratée à 55 %) ne fait pas apparaître de second pic de consistance, ni de second minimum des valeurs, nous n'avons donc pas pu déterminer ces paramètres.

L'ajout de GOX entraîne une augmentation des valeurs du pic de consistance (CM1) de 5,5 N.m (5,5 %), et du minimum de couple (Cm1) de 10,6 N.m (18,8 %). Ceci entraîne une diminution de l'affaiblissement (Af1) de la consistance de la pâte.

L'ajout de GOX en présence de glucose provoque un effet stabilisant qui se traduit par l'apparition plus tardive (3,9 min contre 2,6 min pour le témoin) du pic de consistance (tM1), un maintien plus long (2,1 contre 1,3 min pour le témoin) des valeurs de couple au dessus de 95 % de la valeur du pic de consistance (St1). En revanche, l'épaisseur minimum (Cm1) est plus faible de 7,7 N.m par rapport au témoin et l'affaiblissement Af1 est 20 % (52,2 N.m) plus fort que celui du témoin (43,8 N.m).

En présence de glucose seul, le pic de consistance (CM1 = 108,9 N.m) est 10 % plus important par rapport au témoin (CM1 = 99,4 N.m) et les valeurs de couple supérieures à 95 % du pic sont maintenues pendant 2,1 min au lieu de 1,3 min pour le témoin (St1).

En présence de NaCl, la GOX limite la diminution de consistance sur le premier pic (CM1) à 7 % contre plus de 11,5 % sans GOX (88 N.m par rapport à 99,4 N.m) et accentue la stabilité des valeurs (St1 = 8,2 min contre 1,3 min). Notons enfin qu'Ameille *et al.* (2000a) observent un effet raffermissant transitoire dont le temps d'apparition dépend de la dose de GOX utilisée. L'effet raffermissant transitoire avec le sitoxygraphe pour une pâte farine-eau-chlorure de sodium-glucose se situe vers 10 min de pétrissage et permet un gain de couple de 5 N.m. Selon ces auteurs, l'ajout de GOX, en fournissant du peroxyde d'hydrogène active la peroxydase dans la pâte. Celle-ci va permettre la gélification oxydative des pentosanes expliquant ainsi l'effet raffermissant transitoire. Bien que non formellement identifiés, la formation de réseau mixte pentosanes protéines, ou le renforcement des pontages protéiques via les ponts dityrosine (Hanft et Koehler, 2006), ou di-sulfures (Neukom et Markwalder, 1978 ; Hosoney et Faubion, 1981 ; Vemulapalli et Hosoney, 1998 ; Tilley *et al.*, 2001 ; Hanft et Koehler, 2005 ; Piber et Koehler, 2005 ; Nicolas *et al.*, 2007) pourraient être à l'origine des phénomènes observés.



## Résultats et Discussions

**Tableau 54.** Constantes cinétiques ( $K_m$  en mM, et  $V_m$  en  $\mu\text{kat.mL}^{-1}$ ) déterminés pour chacune des enzymes à pH = 4 et à 30 °C pour différents substrats redox et calcul des efficacités catalytiques ( $\text{Eff} = V_m / K_m$  exprimée en pourcent de l'efficacité de PC vis-à-vis de l'AF).

| Substrat |       | AT   | K1   | PC          | TB    | TSN  |
|----------|-------|------|------|-------------|-------|------|
| AF       | $K_m$ | 0,09 | 1,06 | 0,15        | 0,12  | 0,08 |
|          | $V_m$ | 405  | 152  | 760         | 409   | 126  |
|          | Eff   | 89   | 2,8  | 100 (5,06*) | 68    | 33   |
| AS       | $K_m$ | 0,11 | 0,17 | 0,04        | 0,10  | 0,06 |
|          | $V_m$ | 548  | 411  | 601         | 488   | 150  |
|          | Eff   | 99   | 48   | 265         | 98    | 53   |
| ApC      | $K_m$ | 2,36 | 0,63 | 4,82        | 47,83 | 8,81 |
|          | $V_m$ | 190  | 3    | 700         | 1907  | 83   |
|          | Eff   | 1,6  | 0,09 | 2,9         | 0,79  | 0,19 |
| AV       | $K_m$ | 1,27 | 1,25 | 1,04        | 1,32  | 2,01 |
|          | $V_m$ | 370  | 10   | 580         | 278   | 88   |
|          | Eff   | 5,7  | 0,16 | 11          | 4,2   | 0,87 |
| ABTS     | $K_m$ | 0,15 | 0,38 | 0,12        | 0,17  | 0,09 |
|          | $V_m$ | 578  | 367  | 736         | 443   | 149  |
|          | Eff   | 74   | 19   | 121         | 53    | 33   |
| ASR      | $K_m$ | 0,03 | 1,12 | 0,03        | 0,05  | 0,06 |
|          | $V_m$ | 372  | 154  | 621         | 345   | 124  |
|          | Eff   | 238  | 2,8  | 398         | 145   | 42   |

\* la valeur entre parenthèses (efficacité de PC vis-à-vis de l'acide férulique à pH 4) est exprimée en  $\mu\text{kat.mL}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ .

**Tableau 55.** Constantes cinétiques ( $K_m$  en mM, et  $V_m$  en  $\mu\text{kat.mL}^{-1}$ ) déterminés pour chacune des enzymes à pH = 5,6 et à 30 °C pour différents substrats redox et calcul des efficacités catalytiques ( $\text{Eff} = V_m / K_m$  exprimée en pourcent de l'efficacité de PC vis-à-vis de l'AF). Entre crochets, efficacité en pourcent de l'efficacité de PC vis-à-vis d'AF à pH = 4.

| Substrat |       | AT        | K1          | PC         | TB        | TSN         |
|----------|-------|-----------|-------------|------------|-----------|-------------|
| AF       | $K_m$ | 0,08      | 0,66        | 0,08       | 0,08      | 0,05        |
|          | $V_m$ | 224       | 175         | 194        | 157       | 55          |
|          | Eff   | 115 [55]  | 11 [5,3]    | 100 (2,43) | 77 [37]   | 45 [22]     |
| AS       | $K_m$ | 0,08      | 0,05        | 0,04       | 0,03      | 0,03        |
|          | $V_m$ | 250       | 214         | 175        | 128       | 53          |
|          | Eff   | 137 [66]  | 177 [85]    | 197 [95]   | 174 [84]  | 81 [39]     |
| ApC      | $K_m$ | 0,59      | 3,29        | 1,06       | 1,81      | 3,94        |
|          | $V_m$ | 177       | 5           | 161        | 141       | 85          |
|          | Eff   | 12,4 [6]  | 0,06 [0,03] | 6,3 [3]    | 3,2 [1,5] | 0,89 [0,43] |
| AV       | $K_m$ | 0,16      | 2,23        | 0,60       | 0,45      | 0,58        |
|          | $V_m$ | 178       | 12          | 197        | 136       | 52          |
|          | Eff   | 47 [23]   | 0,22 [0,11] | 14 [6,7]   | 12,5 [6]  | 3,7 [1,8]   |
| ABTS     | $K_m$ | 0,06      | 1,62        | 0,12       | 0,18      | 0,11        |
|          | $V_m$ | 173       | 135         | 162        | 136       | 52          |
|          | Eff   | 127 [61]  | 3,4 [1,6]   | 55 [26]    | 31 [15]   | 19 [9,1]    |
| ASR      | $K_m$ | 0,03      | 1,50        | 0,04       | 0,03      | 0,04        |
|          | $V_m$ | 182       | 199         | 158        | 123       | 50          |
|          | Eff   | 231 [111] | 5,5 [2,6]   | 155 [74]   | 155 [74]  | 47 [23]     |

\* la valeur entre parenthèses (efficacité de PC vis-à-vis de l'acide férulique à pH 5,6) est exprimée en  $\mu\text{kat.mL}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ .

## 4.5 La laccase : une enzyme potentiellement intéressante en panification

La démarche mise en œuvre pour étudier les enzymes les plus prometteuses a été dans un premier temps de caractériser en milieu modèle l'action des enzymes (spécificité), valider l'action de celles-ci au sein de la pâte liquide (bioréacteur). A ce stade, deux enzymes candidates ont été retenues : PC (extrait brut) et K1 (enzyme pure). Leur étude (purification de l'enzyme PC, inhibition par le chlorure de sodium) a fait l'objet de deux stages de niveaux BTS et un master (Jeanneau, 2005), et une synthèse des résultats est présentée. Une caractérisation plus fine des mécanismes d'action de ces enzymes sur les substrats potentiels se trouvant dans la pâte (étude de l'oxydation de composés phénoliques en mélange) au pH de celle-ci a été entreprise. En parallèle à cette étude théorique, nous avons également caractérisé l'action des enzymes choisies pendant le pétrissage (consommation d'O<sub>2</sub>, mesure de couple), leurs effets sur les protéines pendant le pétrissage ainsi que l'effet sur les produits panifiés.

### 4.5.1 Etude préliminaire : sélection de deux laccases potentiellement intéressantes en panification (milieu modèle)

Pour étudier l'intérêt potentiel des laccases, 5 solutions d'enzymes ont été fournies par la société Puratos :

- 3 extraits bruts de couleur brune (PC, TB, TSN)
- 2 extraits semi-purifiés, l'un de couleur jaune (AT) et l'autre de couleur bleutée (K1) purifiée (Arnaut *et al.*, 2006).

#### 4.5.1.1 Détermination des constantes cinétiques en milieu modèle

Afin de sélectionner, les enzymes les plus prometteuses, les constantes cinétiques de chacune des enzymes ont été déterminées par polarographie vis-à-vis de substrats phénoliques endogènes (acide férulique (AF), acide sinapique (AS), acide vanillique (AV), acide *para*-coumarique (ApC) , tyrosine (Tyr)), exogènes (acide syringique (ASR)) et synthétique (ABTS) à pH = 4 et à pH = 5,6. Les résultats (K<sub>m</sub> et V<sub>m</sub>) obtenus sont présentés dans les tableaux 54 et 55. Dans la pâte de farine, les concentrations en substrats phénoliques sont pour la plupart d'entre eux très faibles et largement inférieures au K<sub>m</sub>, ce qui signifie que la vitesse



de la réaction enzymatique pour chacun des substrats est proportionnelle à  $\frac{V_m}{K_m}$ . (l'équation de Michaelis-Menten se simplifie en  $v \approx \frac{V_m}{K_m} S$ , si S est très petit). Dès lors, la mesure de l'efficacité de l'enzyme ( $\frac{V_m}{K_m}$ ) revêt une importance particulière pour apprécier le comportement des enzymes dans la pâte. Les efficacités (rapport  $V_m / K_m$ ) sont exprimées en pourcent de l'efficacité de PC (enzyme la plus concentrée) vis-à-vis de l'acide férulique (acide phénolique le plus abondant dans les pâtes).

### 4.5.1.1.1 à pH = 4 et à 30 °C.

Un examen global du tableau 54 montre tout d'abord que parmi les extraits bruts enzymatiques, PC semble être l'enzyme la plus concentrée puisqu'elle présente les  $V_m$  les plus forts quel que soit le substrat oxydé. La solution enzymatique K1 probablement la plus pure car de couleur bleutée, ce qui est logique puisqu'il s'agit d'une enzyme recombinante purifiée en plusieurs étapes (Arnaut *et al.*, 2006), est aussi parmi les moins concentrées. Si on s'intéresse aux constantes d'affinités, on peut dire que toutes les laccases étudiées sont singulières, en effet, la comparaison des enzymes vis-à-vis des  $K_m$  pour un même substrat montre qu'elles sont différentes, mais, à l'exception de K1, les ordres de grandeurs sont similaires pour un même substrat. Nous avons par ailleurs, recherché les enzymes capables d'oxyder la tyrosine. Seules PC, AT et TB, ont une activité laccasique vis-à-vis de la tyrosine, celle-ci reste cependant faible et aux limites de la détection lors d'une mesure par polarographie (quelques  $\text{nkatal}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), ce qui ne permet pas de déterminer des paramètres cinétiques avec suffisamment de précision.

L'examen des résultats du tableau 54 montre que l'AV et l'ApC ne sont pas de bons substrats. Tous les deux ont des efficacités faibles (proches voire nettement inférieures à 10 % de celles observées avec AF) dues soit à des  $K_m$  très élevés ( $K_m = 48 \text{ mM}$  pour TB vis-à-vis de l'ApC) et/ou à des  $V_m$  faibles voire très faibles ( $V_m = 3 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour K1 vis-à-vis de l'ApC). Décrit parfois comme un inhibiteur (Eggert *et al.*, 1996), nous observons que l'ApC est le plus mauvais substrat acide phénolique pour les laccases, résultat en accord avec Garzillo *et al.* (1998). Concernant les autres substrats, à l'exception des activités mesurées avec l'enzyme K1, on peut les classer par rapport à leur affinité ( $\text{ASR} < \text{AS} < \text{AF} < \text{ABTS}$ ). Les  $K_m$  les plus bas sont obtenus pour PC et AT ( $K_m = 0,03 \text{ mM}$ ) vis-à-vis de l'ASR, le plus élevé est mesuré avec TB ( $K_m = 0,17 \text{ mM}$ ) vis-à-vis de l'ABTS. A titre comparatif, les teneurs moyennes en AF et en AS de 7 farines de l'année 2003 sont respectivement de 0,510



## Résultats et Discussions

$\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  et  $0,045 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  (Louarme *et al.*, 2004) soit, pour une pâte hydratée à 60 %, une concentration théorique de 0,59 mM, c'est-à-dire  $4 \cdot K_m$  pour l'acide férulique (respectivement  $0,052 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  soit 1 à 2  $K_m$  vis-à-vis de l'acide sinapique). Il faut cependant rappeler que la plupart des AF sont esterifiés aux arabinoxylanes dans les farines (> 90 %) et que les  $K_m$  sont déterminés sur l'AF libre.

Si on considère les efficacités, du fait de sa forte concentration, PC présente les meilleurs rapports  $V_m/K_m$  pour l'ensemble des substrats testés, notamment pour l'AF (100) et pour l'AS (265) les deux acides phénoliques les plus abondants dans la farine.

Pour terminer, une enzyme se distingue dans le lot étudié. Il s'agit de K1 qui présente les plus faibles affinités pour les substrats AF, AS, ABTS et ASR, ainsi son  $K_m$  vis-à-vis de l'AF est de 1,06 mM alors qu'il est inférieur à 0,2 mM pour tous les autres extraits enzymatiques analysés. A l'opposé, l'affinité de K1 pour AV et surtout ApC est parmi les plus élevées avec néanmoins des valeurs de  $V_m$  très faibles. Ces deux derniers sont les moins bons substrats pour les autres enzymes.

### 4.5.1.1.2 à pH = 5,6 et à 30 °C.

D'après les résultats obtenus à pH = 4, PC est la meilleure candidate pour oxyder les substrats cibles dans la pâte (AF et AS) puisqu'elle présente les meilleures efficacités catalytiques vis-à-vis de ces substrats. Pour ces deux substrats (ainsi que pour l'ABTS et l'ASR), le passage du pH de 4 à 5,6 (pH de la pâte) entraîne une diminution simultanée du  $K_m$  et du  $V_m$  (tableau 55) de l'enzyme PC, mais surtout une diminution importante d'efficacité catalytique de 52 % (vis-à-vis de l'AF) et 64 % (vis-à-vis de l'AS) due à la diminution plus élevée du  $V_m$ . Parmi les extraits bruts (PC, TB, TSN), PC reste tout de même l'enzyme qui a la meilleure efficacité catalytique vis-à-vis de ces deux derniers substrats. Le changement de pH affecte différemment l'activité de l'enzyme K1 puisque son efficacité est doublée vis-à-vis de l'AF et de l'AS, alors qu'elle reste faible vis-à-vis des autres substrats testés. A pH 5,6, l'enzyme K1 possède la seconde meilleure efficacité catalytique vis-à-vis de l'AS par rapport aux autres enzymes étudiées (derrière PC). Par ailleurs, à ce pH, l'extrait enzymatique AT est celui qui possède la meilleure efficacité catalytique vis-à-vis de l'ensemble des composés phénoliques (à l'exception d'AS).

A pH = 4, on se situe en dessous du pKa de la fonction acide carboxylique de la plupart des substrats qui se situe entre 4,34 et 4,58 (Bialk *et al.*, 2005). Tous les substrats sont sous forme protonée. A pH = 5,6, la fonction acide carboxylique est sous forme anionique. La diminution d'activité relative à pH 5,6, moindre capacité à générer un radical phenoxy,

## Résultats et Discussions

Tableau 56. Effet de l'ajout de NaCl (0,2 M) sur l'activité des laccases (nkat.mL<sup>-1</sup>) testées à pH = 5,6 (tampon acétate 0,1 M), 30 °C, mesurée par polarographie vis-à-vis de deux concentrations en AF.

|            | [AF] = 2 mM |            | [AF] = 0,2 mM |           |
|------------|-------------|------------|---------------|-----------|
|            | sans NaCl   | avec NaCl  | sans NaCl     | avec NaCl |
| <b>AT</b>  | 207         | 158 (76 %) | 161           | 70 (43 %) |
| <b>K1</b>  | 107         | 75 (70 %)  | 42            | 20 (47 %) |
| <b>PC</b>  | 180         | 173 (96 %) | 140           | 75 (54 %) |
| <b>TB</b>  | 145         | 84 (58 %)  | 111           | 44 (40 %) |
| <b>TSN</b> | 52          | 29 (56 %)  | 44            | 16 (36 %) |

pourrait être reliée à la stabilisation de la fonction acide carboxylique déprotonée à ce pH, rendant plus lente la vitesse de transfert d'un électron lors de l'oxydation du composé par la laccase. Concernant les enzymes (dont le pI est inférieur à 4), l'augmentation du pH provoque un accroissement de la charge négative de façon plus ou moins importante selon les enzymes sans modifier le signe de la charge globale (AT est la plus acide avec un pI = 2,6 et PC la moins acide avec un pI = 3,7). L'augmentation du pH modifie les phénomènes électroniques mais ne modifie pas le classement relatif des substrats selon leur efficacité catalytique.

En effet, l'ApC, l'AV et l'ABTS restent les substrats les plus médiocres (du plus au moins médiocre) quelle que soit l'enzyme et quel que soit le pH. A pH = 4 et à pH = 5,6, les efficacités enzymatiques pour les enzymes étudiées montrent que les substrats phénoliques comportant 2 fonctions méthoxy en *ortho* de la fonction phénolique (ASR et AS) sont ceux pour lesquels l'efficacité est la plus élevée, quel que soit l'extrait enzymatique. La présence d'une seule fonction méthoxy en *ortho* de la fonction phénolique ne conduit à un bon substrat que si elle est associée à la présence d'une double liaison conjuguée au cycle benzénique (chaîne propénoïque de l'AF). Dans le cas de l'AV où la double liaison conjuguée au cycle benzénique est absente, l'efficacité des extraits enzymatiques diminue fortement. L'absence de fonction méthoxy pénalise également l'activité des extraits que nous avons étudié (cas de l'ApC). La présence de deux groupements méthoxyl substitués favorise la délocalisation électronique en minimisant l'encombrement stérique (Xu, 1996).

### 4.5.1.2 Effet du NaCl 0,2 M sur l'activité laccasique

Les ions halogénures et en particulier les chlorures sont des inhibiteurs connus de l'activité des laccases (Xu, 1996). Or le chlorure de sodium est un des 4 ingrédients essentiels de la pâte boulangère. L'effet inhibiteur du NaCl pour chacune des enzymes étudiées a donc été déterminé en mesurant l'activité laccasique par polarographie à 30 °C et à pH = 5,6 vis-à-vis de l'acide férulique (2 et 0,2 mM) en présence ou non de NaCl (0,2 M). Les résultats présentés dans le tableau 56 montrent que l'effet inhibiteur du NaCl est plus important à la faible concentration en AF (activité résiduelle entre 36 et 54 %). A la concentration de 2 mM, l'activité en présence de NaCl est comprise entre 56 % pour TSN à 96 % pour PC, cette dernière n'est pratiquement pas affectée par le NaCl lorsque le substrat se trouve à la concentration proche du Vmax. L'enzyme K1 en présence de NaCl conserve 70 % de son activité pour [AF] = 2 mM et 47 % pour [AF] = 0,2 mM. Dans la pâte la concentration en AF est de l'ordre du mM ce qui signifie que lors du pétrissage PC et K1 devraient être moins affectées par la présence du NaCl que les autres enzymes étudiées.



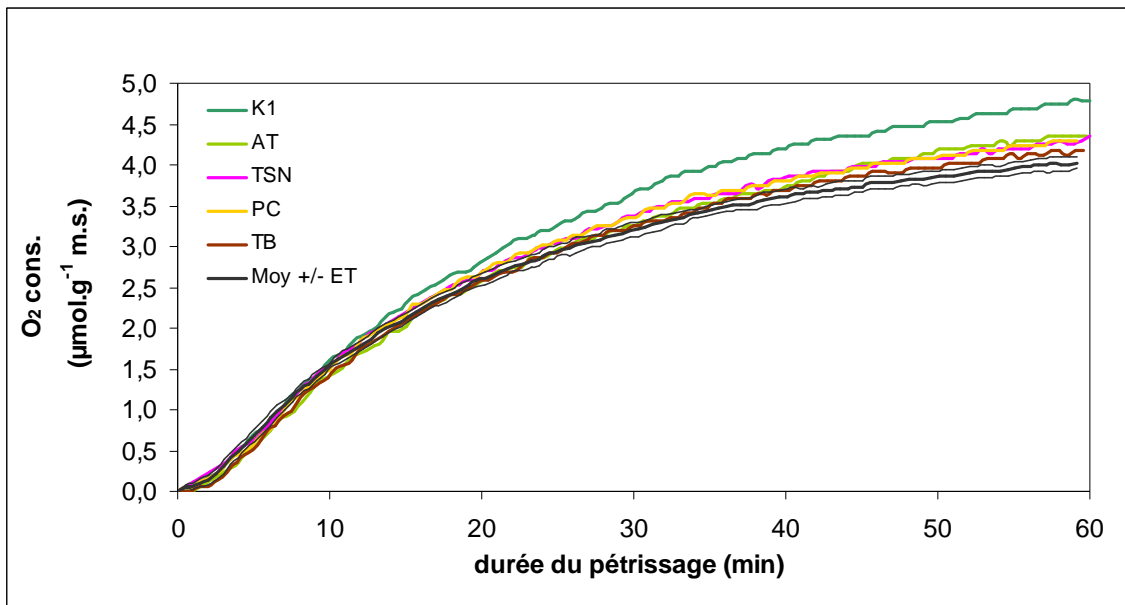


Figure 132. Evolution des consommations d'oxygène au bioréacteur pour des pâtes supplémentées en laccases (AT, K1, PC, TB, TSN) à activité constante de 0,5  $\mu$ kat vis-à-vis de l'AF 2mM.

#### **4.5.1.3 Effet de l'ajout de laccase sur la consommation d'O<sub>2</sub> d'une base farine (BF14) au bioréacteur**

Pour faire un choix parmi les oxydoréductases fournies par le groupe PURATOS, des essais préliminaires de pétrissage au bioréacteur ont été réalisés. La farine utilisée est la BF14 et les conditions de pétrissage sont les suivantes : la pâte composée de 325 g de farine, 227,5 g d'eau distillée et 6,5 g de NaCl est malaxée pendant 60 min à 200 rpm à 30 °C. Les solutions de laccases sont ajoutées dans l'eau distillée et le volume de chaque solution enzymatique est calculé de façon à introduire une quantité d'activité identique dans la cuve. L'activité de référence est mesurée en milieu modèle tamponné (tampon acétate 0,1 M à pH = 4 à 30 °C) vis-à-vis de l'acide férulique ([AF] = 2 mM).

Pour chaque enzyme, une première activité de 0,5  $\mu$ kat mesurée par polarographie (1,8 nkat.g<sup>-1</sup> ms) est ajoutée dans la pâte. Les résultats présentés dans la figure 132 montrent que toutes les enzymes entraînent une surconsommation d'O<sub>2</sub> total en fin de pétrissage d'environ 0,5  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> ms ce qui représente près de 12,5 % de gain de consommation par rapport à la consommation totale témoin (4  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> ms) à l'exception de K1. En effet, cette enzyme provoque une surconsommation de 1  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> ms, surconsommation qui débute vers 10-12 min de pétrissage. Lors de l'ajout de cette activité laccasique dans le pétrin, la surconsommation est visible vers 20-30 min pour toutes les autres enzymes. Il est important de noter que malgré une faible activité de K1 vis-à-vis de l'AF, la surconsommation provoquée par cette enzyme est importante. Les laccases sont des enzymes peu spécifiques capables d'oxyder un grand nombre de substrats, cependant l'activité de K1 vis-à-vis de l'AF et de l'AS est plutôt faible (en milieu modèle). De plus, toujours en milieu modèle, cette enzyme n'est pas capable d'oxyder la tyrosine (résultat non montré). Il est possible que K1 fonctionne via des systèmes médiateurs pour oxyder les substrats de la farine, ou encore que malgré l'encombrement stérique elle possède une activité importante vis-à-vis des AF estérifiés aux arabinoxylanes comparée à l'AF libre (milieu modèle) ce qui ne serait pas le cas des autres extraits enzymatiques dont le taux de pureté est plus faible. Ce résultat surprenant étant donné les caractéristiques de l'enzyme est donc encourageant. Le volume d'enzyme ajoutée représente environ 6 mL, étant donné la forte surconsommation engendrée, nous avons décidé de diviser la dose par deux dans un second essai. Lorsqu'on ajoute une activité de 0,25  $\mu$ kat en cuve, la surconsommation d'O<sub>2</sub> provoqué par l'ajout de K1 est environ 2 fois moins importante (figure 133.B). Pour toutes les autres enzymes (AT, PC, TB et TSN) dont nous disposons en quantités importantes, nous avons décidé de multiplier par quatre l'activité

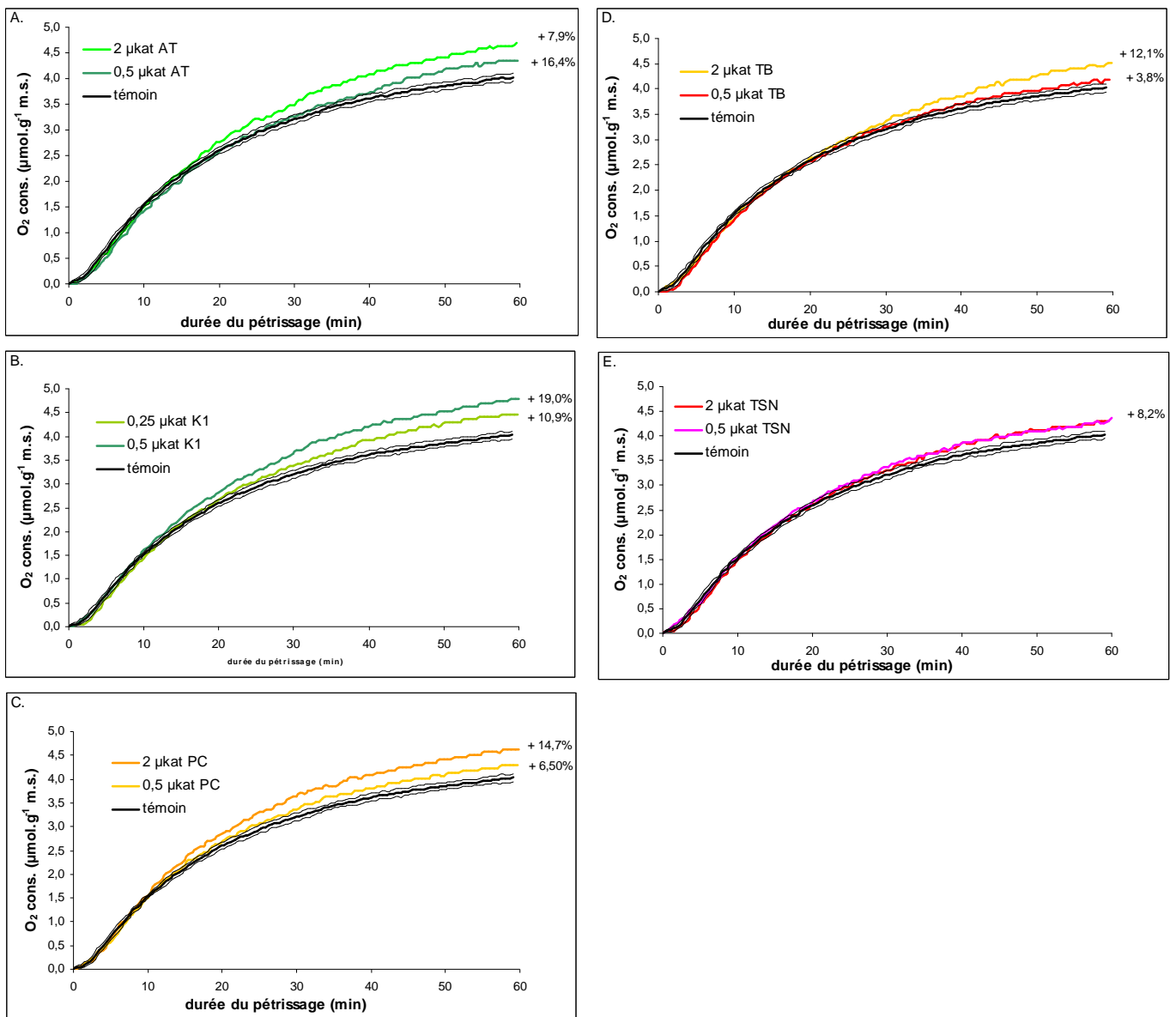


Figure 133. Effet de la quantité d'activité ajoutée en cuve sur les consommations d'O<sub>2</sub> mesurée au Bioréacteur : 0,5 et 2 μkat pour toutes les enzymes sauf pour K1 (0,25 et 0,5 μkat), activité mesurée vis-à-vis de l'AF 2 mM à pH = 5,6

## Résultats et Discussions

---

soit 2  $\mu$ kat (figure 133.A-C-D-E). Les effets doses sont représentés sur les graphiques de la figure 133 et montrent que la surconsommation d' $O_2$  engendrée dépend de l'enzyme :

- on peut classer les enzymes par ordre croissant de surconsommation, cela donne TB (3,8 %) < PC (6,5 %) < AT (7,9 %) < TSN (8,2 %) lorsqu'on ajoute 0,5  $\mu$ kat.
- un classement sensiblement différent est obtenu à forte dose (2  $\mu$ kat) (TSN (8,2 %) < TB (12,1 %) < PC (14,7 %) < AT (16,4 %)).

De plus, la comparaison de l'effet des différentes laccases montre que la surconsommation est visible plus tôt (vers 10 min à forte dose) dans le cas des laccases PC et K1 (figure 133.B et C). Pour les autres enzymes, elle apparaît vers 20 min de pétrissage (figure 133.A, D et E). On peut raisonnablement penser que les deux premières enzymes sont plus rapidement actives dans la pâte.

La seule observation des courbes de consommation d' $O_2$  permet seulement de conclure que toutes les laccases étudiées influencent les réactions d'oxydation se produisant au sein de la pâte (en milieu sur hydraté par rapport à une pâte boulangère classique). Il est cependant difficile de quantifier la part prise par le système laccasique dans la consommation d' $O_2$ . En effet, à un instant  $t$  de pétrissage, la présence d'une enzyme exogène (laccase) consommatrice d' $O_2$  entraîne l'apparition d'une compétition vis-à-vis de celui-ci (limitation de l'incorporation d' $O_2$  dans la pâte). La réorientation de la consommation d' $O_2$  vers le système exogène peut aussi être favorisée si celui-ci contient un inhibiteur des activités endogènes (dans l'extrait brut par exemple) ou l'inverse si un activateur est présent. Enfin, la répartition de l'oxygène consommé entre les différents systèmes enzymatiques présents est conditionnée par leurs affinités respectives vis-à-vis de ce gaz, ces affinités étant elles-mêmes conditionnées par les conditions physico-chimiques dans lesquelles se déroule la réaction. Lorsque l'oxydation avance, la teneur en substrats oxydables diminue et les produits générés peuvent être inhibiteurs (ou activateurs). Ainsi, la modification de la réaction par une enzyme exogène (la laccase, par exemple) à l'instant  $t$  du pétrissage se répercute sur les réactions à l'instant  $t+1$ . On peut tout de même dire qu'au vu des allures des courbes de consommation obtenues en présence des enzymes PC et K1, l'apparition précoce des surconsommations montre que l'impact de ces enzymes sur les réactions d'oxydation dans la pâte a lieu dès le début du pétrissage.

Pour terminer, sur les 5 laccases étudiées, pour lesquelles nous avons déterminé les constantes cinétiques à pH 4 et à pH 5,6 (30 °C), étudié l'effet du NaCl ( $[NaCl] = 0,2$  M) à pH = 5,6 (30 °C) et mesuré leur effet sur la consommation d'oxygène d'une pâte de farine de

**Tableau 57. Bilan des étapes de purification de 2 mL de l'extrait brut (EB) de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* donné pour 1 mL d'extrait.**

| <b>Etape</b>         | <b>Activité totale (nkat)</b> | <b>Protéines (µg)</b> | <b>Activité spécifique (nkat.mg<sup>-1</sup>)</b> | <b>Rendement (%)</b> | <b>Taux de purification</b> |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|---|----------------------|-----------------------------|
| EB (2 mL)            | 765                           | 1500                  | 510   | 100                  | 1                           |
| Dialyse              | 690                           | 1186                  | 582   | 90                   | 1,14                        |
| Chromatographie (P1) | 547                           | 342                   | 1600  | 72                   | 3,14                        |
| Chromatographie (P2) | 60                            | 58                    | 1030  | 8                    | 2,02                        |

blé tendre lors du pétrissage au bioréacteur, on peut dire que PC et K1 sont les deux enzymes les plus prometteuses. Ces deux enzymes sont les moins sensibles aux ions  $\text{Cl}^-$  inhibiteurs des laccases. PC est très active vis-à-vis de l'AF, le substrat cible dans la pâte et K1 provoque une surconsommation d'oxygène importante quand elle est ajoutée dans le bioréacteur. Dans la suite du travail, l'enzyme PC a été étudiée spécifiquement et les résultats obtenus ont été comparés de façon ponctuelle avec ceux obtenus avec l'enzyme K1 (disponible en moins grande quantité).

### 4.5.2 Purification de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*

Après les essais préliminaires conduisant à la sélection de PC, un nouvel extrait enzymatique nous a été fourni par la société PURATOS. Cet extrait produit dans les mêmes conditions que le premier a été utilisé pour les étapes de purification. Ces constantes cinétiques déterminées à  $\text{pH} = 4$  vis-à-vis de l'AF ( $K_m = 0,14$  et  $V_{\text{max}} = 405 \text{ nkat.mL}^{-1}$ ) et de l'AS ( $K_m = 0,05$  et  $V_{\text{max}} = 300 \text{ nkat.mL}^{-1}$ ) montre que ce second extrait est moins concentré que le premier. L'objectif de cette partie du travail est l'élimination de contaminants éventuels protéiques mais aussi phénoliques (forte coloration) à partir d'un protocole rapide tout en conservant un rendement élevé pour permettre la caractérisation physico-chimique de l'enzyme sous une forme semi-purifiée

#### 4.5.2.1 Purification en deux étapes

Tout d'abord, un protocole en deux étapes a été utilisé, une dialyse de l'extrait brut (EB) suivie d'une chromatographie d'échanges d'ions de l'extrait dialysé (ED) sur une colonne Mono Q<sup>®</sup> HR 5/5 (échangeuse d'anions). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 57. La première étape de dialyse provoque une légère diminution d'activité (près de 10 %) associée à une élimination partielle des protéines conduisant à un faible taux de purification (1,1). La seconde étape de chromatographie d'échange d'ions permet de séparer deux fractions actives (P1 et P2). P1 contient une activité de 547 nkatal et représente près de 80 % de l'activité déposée et de 72 % de l'activité de l'extrait brut. P2, minoritaire, contient 60 nkatal soit moins de 9 % de l'activité déposée. Globalement, le rendement de ce protocole de purification est de 80 % (somme des pics P1 et P2) en accord avec notre objectif (rendement élevé et procédure rapide). Les concentrations en protéines données dans le tableau 57 sont issues de dosages réalisés par la méthode du micro Bradford. A partir de ces

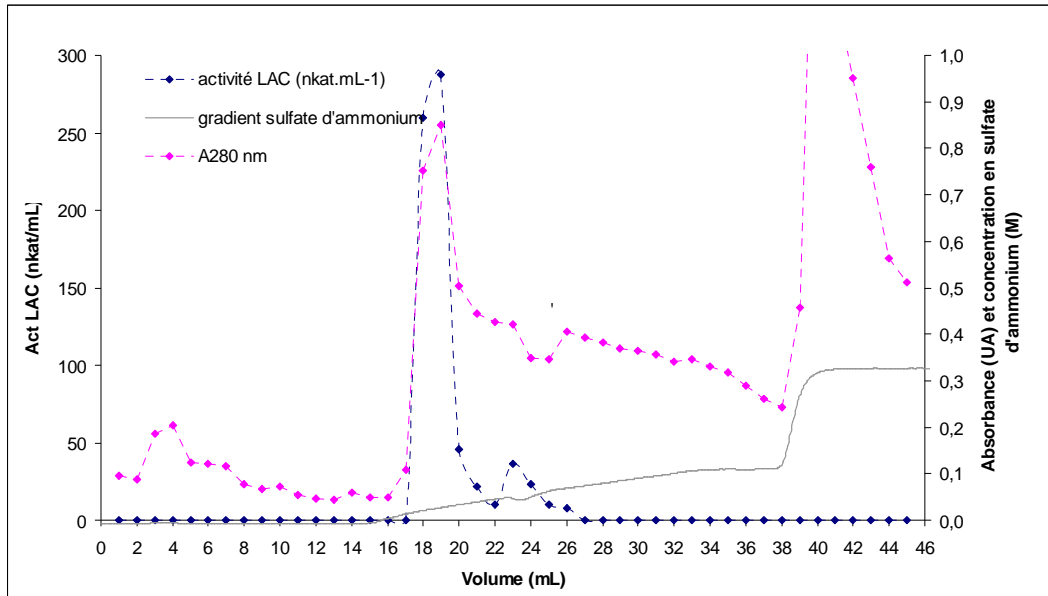


Figure 134. Profil d'élution obtenu lors de l'étape de chromatographie d'échange d'ions.

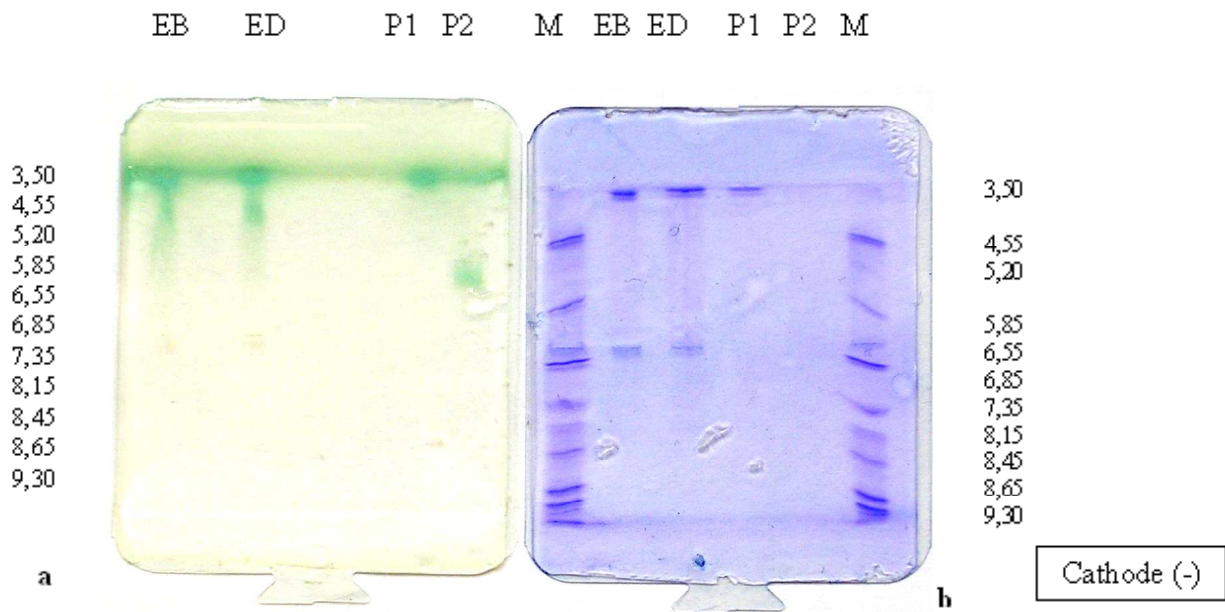


Figure 135. Isoélectrofocalisation (IEF gradient de pH 3-10) de la laccase PC. a. révélation spécifique (ABTS 2 mM). B. révélation non spécifique au bleu de Coomassie.

données, les taux de purification globaux sont légèrement supérieurs à 3 et 2 pour les pics P1 et P2 respectivement, ce qui est relativement modeste.

Par ailleurs, le profil d'élution montre la présence de deux fractions actives lorsque le gradient de force ionique est appliqué (figure 134). P1 est élué lorsque la concentration en sulfate d'ammonium est égale à 0,03 M et regroupe les fractions 18 et 19. P2 est élué lorsque la concentration en sulfate d'ammonium atteint 0,05 M. De plus, les pics P1 et P2 sont exempts de coloration (contrairement à l'extrait dialysé) alors qu'une partie de cette dernière se retrouve dans les fractions éluées en fin de chromatographie (fractions 40 à 44). Si l'on tient compte des fractions actives qui ont été écartées (fractions 20, 21, 22 et 25), le rendement de la chromatographie d'échange d'ions est voisin de 100 % ce qui confirme la stabilité de l'activité laccasique de cet extrait dans ce type de chromatographie.

La procédure de purification en deux étapes employées a donc permis d'éliminer un certain nombre de composés contaminants (protéines, phénols) sans perdre d'activité ou presque. De plus, deux isoformes ont été isolées (P1 et P2), P1 étant majoritaire. Otterbein *et al.* (2000) ont décrit la présence d'une seconde isoforme de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*. Enfin, ce protocole, répété à plusieurs reprises, montre une excellente répétabilité du profil chromatographique. Toutefois, les rendements récupérés ont légèrement baissé probablement due à une fixation irréversible des phénols oxydés sur le gel.

### **4.5.2.2 Caractéristiques physico-chimiques de la laccase purifiée**

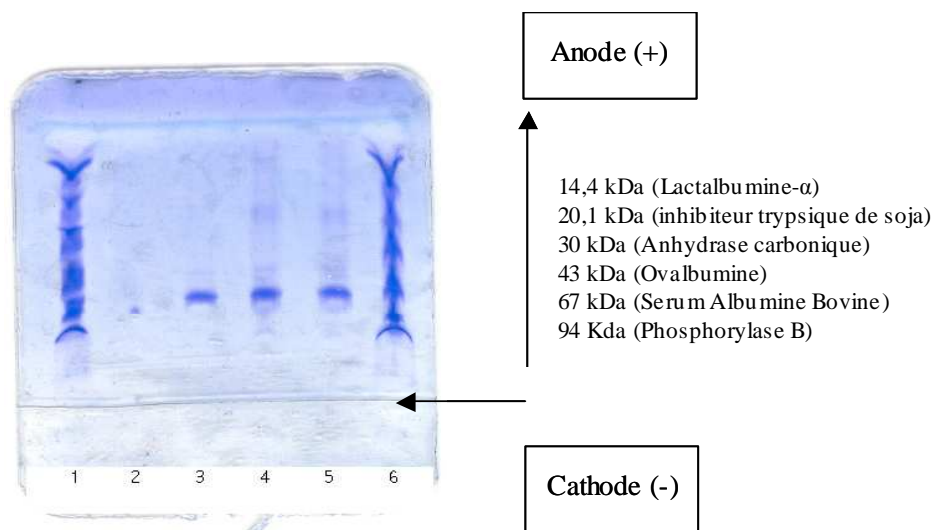
Les extraits bruts et dialysés ainsi que les deux fractions purifiées P1 et P2 ont été caractérisés par deux types d'électrophorèse.

#### **4.5.2.2.1 Isoélectrofocalisation (I.E.F) sur gel de polyacrylamide**

Pour estimer le pI des différents extraits, un gel de polyacrylamide est utilisé avec des marqueurs de pH allant de 3 à 9. La révélation au bleu de Coomassie (figure 135.A) montre la présence d'une bande majoritaire autour d'un pI de 3,7 pour les fractions EB, ED et P1. Une bande minoritaire est visible autour d'un pHi de 6,5 pour EB et ED et est absente dans la fraction P1. La fraction P2 montre une très fine bande à un pHi de 3,7.

L'apparition de la coloration verte spécifique à l'ABTS (figure 135.B) est immédiate et les bandes actives s'étalent très rapidement, rendant difficile une détermination précise des pI correspondants. Cependant, la révélation spécifique montre, dans tous les cas, une bande





**Figure 136 : Electrophorèse SDS PAGE (révélation au bleu de Coomassie)**

**1 et 6** : Marqueurs LMW en conditions dénaturantes; **2** : extrait P2 ; **3** : extrait P1 ; **4** : extrait dialysé (ED) ;  
**5** : extrait brut (EB)

active à pH 3,7. Cette valeur de pH correspond à celles signalées dans la littérature (Eggert *et al.*, 1996) pour la laccase de PC.

La fraction P2 montre également une coloration autour de pH 6. Cette valeur de pI est étonnante puisque les conditions de la chromatographie d'échanges d'ions ne devraient pas permettre de fixer des protéines dont le point isoélectrique est supérieur à pH 4,5.

### 4.5.2.2 Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse en gradient de porosité en conditions dénaturantes a été réalisée sur les mêmes échantillons que pour l'I.E.F. avec un gel de polyacrylamide permettant la séparation des protéines entre 10 et 250 kDa, en présence de SDS. La révélation des protéines est effectuée avec du bleu de Coomassie. Des marqueurs moléculaires protéiques de masses moléculaires comprises entre 14 et 94 kDa ont été utilisés.

L'électrophorèse (figure 136) révèle une bande majoritaire vers 67 kDa ainsi que plusieurs autres bandes minoritaires autour de 20, 43 et vers 90 kDa pour les extraits bruts et dialysés indiquant la présence d'autres molécules. En revanche, pour les extraits purifiés P1 et P2, la bande de 67 kDa est très nette pour la fraction P1 et peu apparente pour P2. Pour ce dernier extrait, un simple point coloré vers 90 kDa est aussi visible.

Ces résultats sont en accord avec la taille de la laccase PC déterminée par Eggert *et al.* (1996) autour de 81 kDa. De plus, Otterbein *et al.* (2000) indiquent également que la seconde isoforme de PC a une masse moléculaire légèrement supérieure (86 kDa) en accord avec nos résultats. Les conditions d'électrophorèse mise en œuvre ne permettent pas de discuter de la taille des isoformes de laccase PC avec plus de précision.

### 4.5.3 Inhibition de l'activité laccasique par les ions Cl<sup>-</sup>

Les ions halogénures sont des inhibiteurs plus ou moins puissants de l'activité laccasique (Xu, 1996). Plusieurs auteurs ont étudié leur effet inhibiteur (Eggert *et al.*, 1996 ; Xu, 1996 ; Garzillo *et al.*, 1998 ; Robert, 2001). Dans une pâte boulangère, le teneur en chlorure de sodium est de l'ordre de 1,8 à 2 % par rapport au poids de farine. Par conséquent, plusieurs expériences ont été réalisées pour déterminer l'effet d'ajout de NaCl en milieu tamponné sur l'activité laccasique, pour déterminer le mécanisme d'inhibition du NaCl sur l'activité, étudier la stabilité de l'activité en présence de NaCl ainsi que la réversibilité de l'inhibition.

**Tableau 58. Effet de l'exposition de la laccase PC aux ions chlorures**

|                | Temps d'incubation (h) | Activité LAC (%)   |
|----------------|------------------------|--------------------|
| Témoin         | -                      | 100                |
| [NaCl] = 10 mM | 0                      | 68,9 ( $\pm 0,4$ ) |
|                | 12                     | 47,4 ( $\pm 0,4$ ) |
|                | 20                     | 42,4 (nd)          |
| [NaCl] = 6 mM  | 0                      | 70,1 ( $\pm 0,9$ ) |
|                | 12                     | 59,5 ( $\pm 1,2$ ) |
|                | 20                     | 48,6 ( $\pm 0,4$ ) |

Concernant le mécanisme d'inhibition, le fait d'ajouter du NaCl (1 et 3 mM) dans le milieu provoque une augmentation du  $K_m$  et peu de variation sur le  $V_{max}$  déterminé par polarographie vis-à-vis de l'AF (à pH = 4 et T = 30 °C) (Jeanneau, 2005). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'activité laccasique est mesurée par spectrophotométrie dans les mêmes conditions de pH et de température. En négligeant l'effet sur le  $V_{max}$ , la constante d'inhibition déterminée par Jeanneau (2005) est voisine de 3 mM. Ce résultat indique le fort pouvoir inhibiteur des ions Chlorure, puisque la concentration au sein de la pâte avoisine les 400 mM. Le caractère compétitif de l'inhibition de l'activité laccasique par le NaCl dans le cas de la laccase PC mesurée vis-à-vis de l'AF est plus marqué que pour le mécanisme déterminé par Robert (2001) et Garzillo *et al.* (1998), qui décrivent une inhibition de type mixte pour les laccases de *Trametes versicolor* et *Trametes trogii* respectivement. Garzillo *et al.* (1998) précisent que les constantes d'inhibition dépendent de la taille du substrat qui va influencer l'accessibilité au site actif des ions halogénures. Selon Xu (1996), les ions Cl<sup>-</sup> limitent l'accessibilité du substrat aux atomes de cuivre situés dans la partie T2/T3 du site actif de l'enzyme.

Par la suite, l'effet du temps d'exposition de l'enzyme avec l'inhibiteur a été étudié. Les résultats présentés dans le tableau 58 montrent l'activité LAC résiduelle mesurée vis-à-vis de l'AF 2 mM à pH = 4 et 30 °C lorsque l'inhibiteur ([NaCl] = 6 et 10 mM en solution) est mis en présence de l'enzyme pendant des temps de 0, 12 et 20 h. Pour chaque dose, dès la mise en contact, une diminution d'activité d'environ 30 % (pour les deux doses de NaCl ajoutées) apparaît. Ensuite, plus la durée d'exposition est longue, plus l'activité résiduelle mesurée est faible. La diminution d'activité est proportionnelle au temps d'exposition de l'étude et le facteur de proportionnalité est quasiment le même pour les deux doses d'inhibiteur ajoutées. La plus faible activité résiduelle (42,4 %) est mesurée après 20 h d'exposition de l'enzyme avec du NaCl 10 mM. Ces résultats indiquent que l'interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme provoque une modification lente de celle-ci qui altère son pouvoir catalytique. Enfin, la réversibilité de l'inhibition a été mesurée par dialyse ou dessalage rapide sur colonne de gel filtration (PD-10, Sephadex) d'extraits de laccases incubés avec du NaCl (0,3 M). Dans les deux expériences, réalisées à la fois sur l'extrait brut PC et le pool P1 (après purification par chromatographie d'échanges d'ions), plus de 85 % de l'activité est récupérée (données non montrées). L'inhibition de l'activité laccasique par le chlorure de sodium est donc largement réversible.

A titre comparatif, le mécanisme d'inhibition de la laccase K1 par le chlorure de sodium a aussi été étudié en mesurant l'apparition du produit d'oxydation de l'ABTS à 405 nm

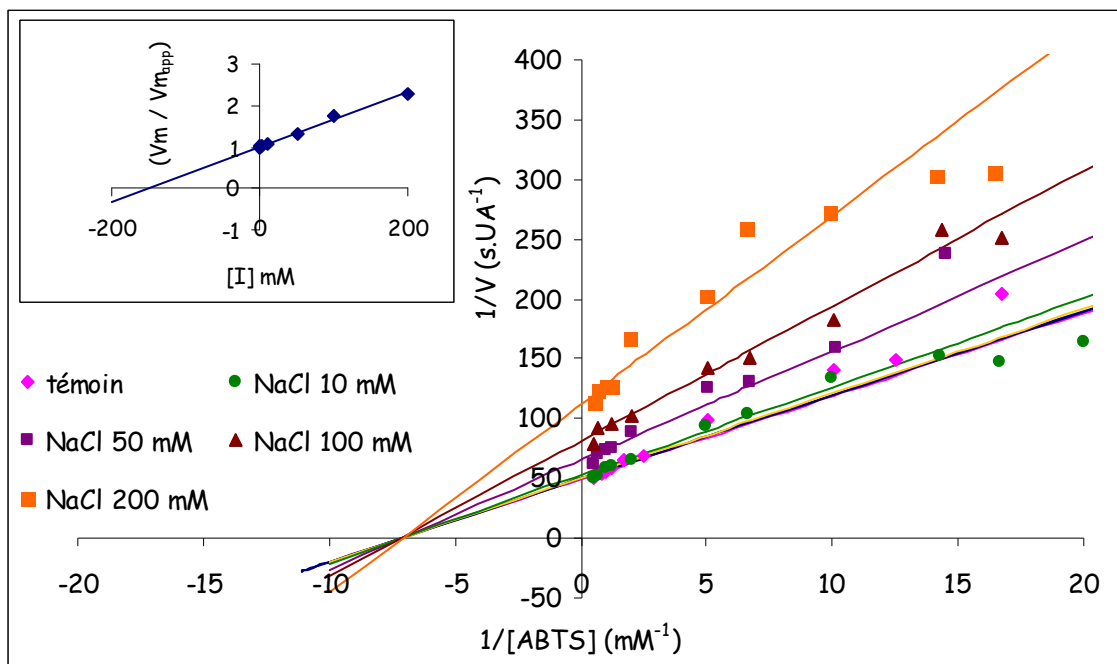


Figure 137. Effet de doses croissantes de chlorure de sodium (10 à 200 mM) sur l'activité de la laccase K1 mesurée vis-à-vis de l'ABTS par spectrophotométrie à pH = 5,6 et à 30 °C (Représentation de Lineweaver-Burke) en icône, graphique secondaire.

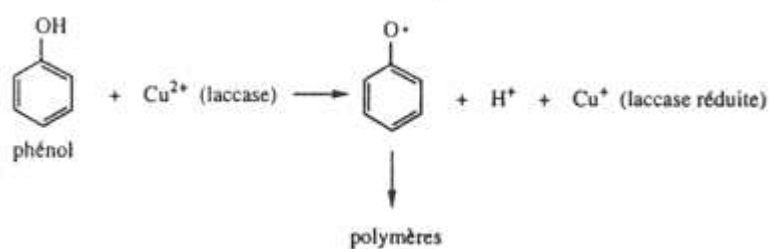


Figure 138. Mécanisme d'oxydation des phénols par la laccase (Brown, 1967)

(tampon acétate, pH = 5,6, 30 °C) pour des doses de NaCl comprises entre 10 et 200 mM. Les résultats sont fournis sur le graphique de la figure 137 et montre une inhibition de type non compétitif. La constante d'inhibition ( $K_i$ ) déterminée à l'aide du graphique secondaire est égale à 150 mM.

La comparaison de la sensibilité au NaCl des enzymes PC et K1 ne peut être effectuée puisque les substrats et les pH utilisés pour les mesures d'inhibition sont différents pour les 2 extraits enzymatiques (le manque de temps ne nous a pas permis de pousser plus avant cette étude). Robert (2001) préconise de porter une attention particulière à l'utilisation des laccases, en incorporant de façon la plus tardive possible le chlorure de sodium lors du pétrissage pour permettre à l'enzyme d'agir dans la pâte, mais aussi au vu de nos résultats limiter l'effet dans le temps du NaCl sur l'enzyme. Le fait d'ajouter le chlorure de sodium en fin de pétrissage est une pratique couramment utilisée par les boulangers pour obtenir une pâte moins crème (en raison de l'effet négatif du NaCl sur l'action de la lipoxygénase).

### 4.5.4 Oxydation de mélanges de phénols en milieu modèle

Les laccases sont capables d'oxyder les *ortho*- et *para*-diphénols ainsi que les *para*-monophénols. Dans le cas de l'AF, l'oxydation a lieu selon le mécanisme proposé par Brown (1967) avec formation d'une semiquinone (figure 138). Un électron est échangé entre un atome de cuivre au niveau du site actif de l'enzyme et le phénol, conduisant à la formation d'une espèce radicalaire oxydée (la semiquinone) pouvant réagir avec d'autres composés du milieu. En conditions aérobies, 1/2 mole d' $O_2$  fixe deux protons libérés lors de l'oxydation de deux molécules du phénol (libération d'une molécule d'eau). Dans le cas de l'AF libre en milieu modèle, son oxydation par la laccase entraîne la formation de dimères, principalement les acides 5-5' et 8-5' benzo di-férulique ainsi que la 8-8' gamma-lactone (structures données dans la figure 28). En présence de POD et d' $H_2O_2$ , Garcia (2000) observe aussi une disparition d'AF estérifié, attribuée à la formation de dimères. La formation de dimères d'AF estérifié aux arabinoxylanes explique également la gélification oxydative des pentosanes (Neukom et Markwalder, 1978 ; Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998b). De nombreux travaux ont été réalisés pour détailler les mécanismes de réactions secondaires suivant l'apparition des semiquinones libres (Robert, 2001 ; Rakotozafy *et al.*, 2004a et 2004b) ou estérifiés (Garcia, 2000 ; Garcia *et al.*, 2002b), au sein de la pâte ou sur des solutions d'arabinoxylanes, en présence de phénols, thiols, acides aminés ou acide ascorbique (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998a ; Figueroa-Espinoza et Rouau, 1999 ; Robert, 2001). L'ensemble des résultats montrent

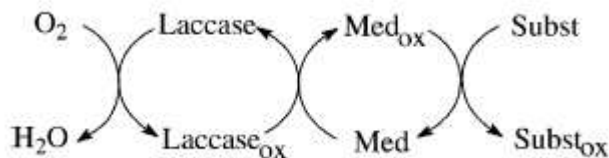


Figure 139. Mécanisme mis en jeu lors de l'oxydation par un système laccase en présence d'un médiateur (d'après Fabrinni *et al.*, 2002)

Tableau 59. Constantes cinétiques du nouvel échantillon de PC vis-à-vis de l'AF et de l'AS déterminé par polarographie à pH = 4 et à 30 °C

|                             | AF   | AS   |
|-----------------------------|------|------|
| Km (mM)                     | 0,14 | 0,05 |
| Vm (nkat.mL <sup>-1</sup> ) | 405  | 360  |

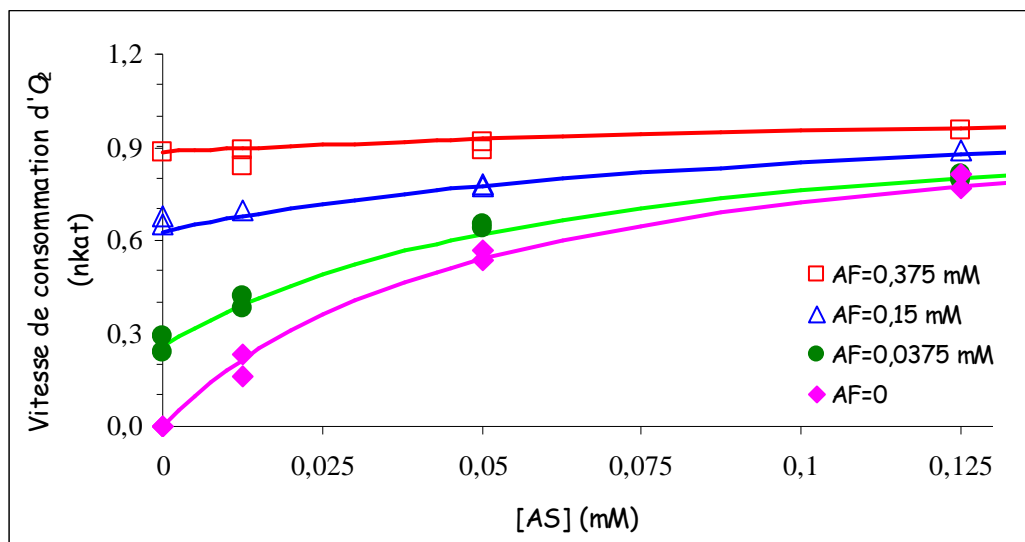


Figure 140. Vitesse de consommation d'oxygène (à pH = 4 et à 30 °C) dans les mélanges AF-AS en présence de la laccase PC (trait plein : courbe modélisée).

que les radicaux féruloyl libres sont susceptibles de jouer un rôle de médiateur (figure 139, Fabbrini *et al.*, 2002) pour ensuite co-oxyder les thiols, l'AF estérifiés, ou d'autres phénols. Cependant, la formation de liaison covalente entre des résidus AF de pentosanes et des acide aminés des protéines n'a jamais été formellement démontrée, bien que des tentatives aient été réalisées (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1999a).

Après avoir étudié l'activité des laccases K1 et PC vis-à-vis de substrats seuls en milieu modèle, des milieux plus complexes avec des mélanges de substrats phénoliques ont été employés. En mettant en présence dans le milieu plusieurs substrats potentiels (AF, AS, DOPA, tyrosine) de la laccase au sein de la pâte, l'objectif était d'étudier la possibilité d'utiliser un médiateur d'oxydation (AF ou ABTS) pour tenter de former des liaisons covalentes entre le réseau des pentosanes et celui du gluten. Dans plusieurs expérimentations sur les mélanges, les quantités d'O<sub>2</sub> consommé ainsi que les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> ont été mesurées par polarographie et simultanément les évolutions des composés phénoliques du milieu ont été mesurées par CLHP. En présence d'ABTS, les cinétiques ont été mesurées par spectrophotométrie.

### **4.5.4.1 Mélanges AF-AS (pH 4 à 30 °C).**

Dans cette partie, un nouvel extrait brut de laccase PC, moins concentré, a été fourni par la société Puratos. Les caractéristiques cinétiques de cet échantillon d'enzyme vis-à-vis de l'AF et de l'AS ont été déterminées par polarographie (tableau 59). La laccase PC utilisée montre une affinité 3 fois supérieure pour l'AS par rapport à l'AF, si l'on admet l'assimilation du Km à la constante de dissociation enzyme-substrat, tandis que les Vmax sont très proches. Pour chaque expérience, 1,2 nkat de PC (mesuré par rapport à l'AF 2mM à pH = 4) sont ajoutés dans le milieu réactionnel complexe (volume total = 1,4 mL). Les concentrations variables en AF et AS sont les suivantes : acide phénolique seul, ¼ Km, 1 Km et 2,5 Km, soit pour l'AF 0, 0,0375 mM, 0,15 mM et 0,375 mM et pour l'AS 0, 0,0125 mM, 0,05 mM, 0,125 mM, respectivement. Au total, 15 mélanges ont été étudiés.

Les résultats obtenus sont présentés sur le graphique de la figure 140. L'ajout d'AF, à une concentration constante d'AS, provoque une augmentation de la vitesse de consommation d'oxygène, d'autant plus marquée que la concentration constante en AS est faible. La même observation peut être faite en considérant les résultats obtenus avec l'ajout d'AS à une concentration constante en AF. Pour une concentration en AF de 0,375 mM et au-delà, l'ajout d'AS entre 0,0125 et 0,125 mM est pratiquement sans effet sur la consommation d'oxygène.





## Résultats et Discussions

En appliquant les équations de la cinétique Michaelienne et en considérant, d'une part que l'enzyme agit indépendamment sur les deux substrats phénoliques et, d'autre part, que la quantité d'oxygène consommée par mole de substrat phénolique oxydé est identique pour AF et AS, les résultats expérimentaux ont été modélisés en adaptant le modèle de Janovitz-Klapp *et al.* (1990). Ce modèle a été mis au point sur des mélanges de phénols (4-méthylcatéchol, acide chlorogénique, et (+)-catéchine) oxydés par la polyphénoloxydase isolée de pomme :

$$(XXXVII) \quad V = \frac{\frac{V_{m1} \times S1}{K_{m1}} + \frac{V_{m2} \times S2}{K_{m2}}}{\left( 1 + \frac{S1}{K_{m1}} + \frac{S2}{K_{m2}} \right)}$$

avec,

**S1 et S2** : concentrations de chaque phénol (en mM), respectivement AF et AS

**K<sub>m1</sub> et V<sub>m1</sub>** : constantes cinétiques de l'enzyme vis-à-vis de chaque substrat pris isolément, K<sub>m</sub> en mM et V<sub>m</sub> en nkat. Pour AF, V<sub>m1</sub> = 1,3 nkat et K<sub>m1</sub> = 0,14 mM et pour AS, V<sub>m2</sub> = 1,14 nkat et K<sub>m2</sub> = 0,05 mM.

Les courbes en traits pleins de la figure 140 représentent les valeurs de consommation d'O<sub>2</sub> théoriques calculées. Il apparaît que les résultats expérimentaux sont en accord avec le modèle. Dans ce modèle, la part d'oxygène utilisée par l'enzyme pour oxyder l'AF est représentée par :

$$(XXXVIII) \quad V_{AF} = \frac{\frac{V_{m1} \times S1}{K_{m1}}}{\left( 1 + \frac{S1}{K_{m1}} + \frac{S2}{K_{m2}} \right)}$$

Celle utilisée pour oxyder l'AS est représentée par :

$$(XXXIX) \quad V_{AS} = \frac{\frac{V_{m2} \times S2}{K_{m2}}}{\left( 1 + \frac{S1}{K_{m1}} + \frac{S2}{K_{m2}} \right)}$$

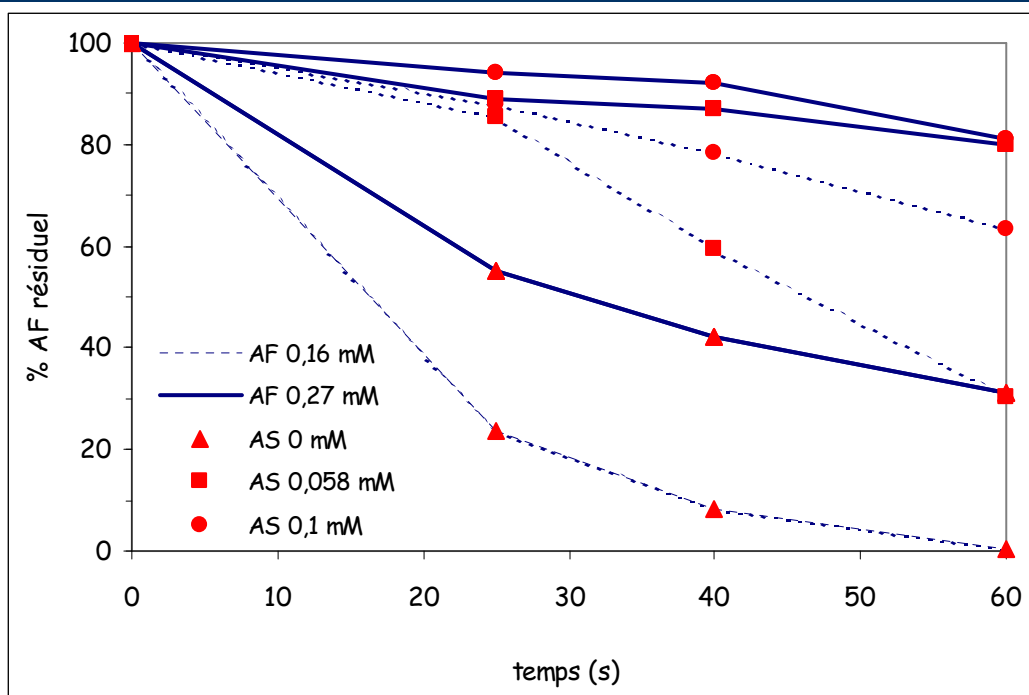


Figure 141. Evolution du pourcentage d'AF dans les milieux contenant de l'AF 0,27 mM (trait plein) ou AF 0,16 mM (trait pointillé) en présence d'AS (0,1 mM ou 0,058 mM) ou non.

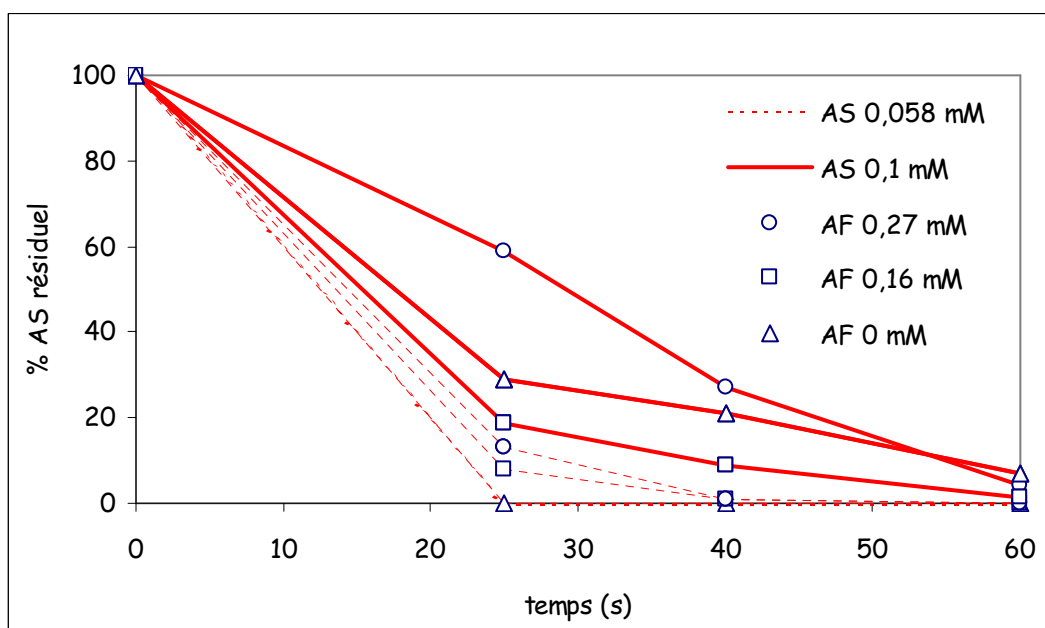


Figure 142. Evolution du pourcentage d'AS dans les milieux contenant de l'AS 0,058 mM (trait pointillé) ou AS 0,1 mM (trait plein) en présence d'AF (0,16 mM ou 0,27 mM) ou non.

## Résultats et Discussions

---

Il en résulte que pour chacun des phénols dans le mélange, par rapport au phénol seul, les vitesses instantanées de consommation des phénols sont ralenties puisque le dénominateur de chacune de ces équations est augmenté (de  $S^2/Km2$  pour  $V_{AF}$  dans l'équation (VI.2) et de  $S1/Km1$  pour  $V_{AS}$  dans l'équation (VI.3)).

Cette étude a été réalisée sur des mélanges d'AF et AS à 3 concentrations soit 0, 0,16 et 0,27 mM pour l'AF et 0, 0,058 et 0,1 mM pour l'AS. Les conditions expérimentales étaient, par ailleurs, identiques c'est-à-dire pH 4, 30 °C et 1,2 nkat de l'extrait de laccase. Pour chacun de ces mélanges, la consommation d'oxygène est mesurée par polarographie en fonction du temps et un volume de 20 µL est prélevé aux temps 0, 25, 40 et 60 s pour être injecté immédiatement dans un appareillage CLHP équipé d'un détecteur UV. Les surfaces des pics d'AF et AS sont déterminées pour chaque temps de cinétique et cela pour l'ensemble des 8 milieux étudiés. Le pourcentage de phénols résiduels est calculé en prenant comme référence, les surfaces obtenues avec le milieu aux temps zéro (sans enzyme).

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 141 pour l'AF d'une part et sur la figure 142 pour l'AS d'autre part. D'après la figure 141, la consommation d'AF est fortement ralentie lorsque des doses croissantes d'AS sont ajoutées au milieu (symboles triangle comparés aux symboles carré et rond). L'effet est plus particulièrement marqué pour la plus faible concentration en AF (0,16 mM, traits pointillés).

En ce qui concerne l'AS (figure 142), l'ajout d'AF provoque un faible ralentissement lorsque la concentration de l'AS est fixée à 0,058 mM (traits pointillés). Pour les concentrations de 0,1mM (traits pleins), l'effet de ralentissement n'est observé que pour l'ajout d'AF à la plus forte concentration (0,27 mM). Si l'on applique les conditions opératoires testées aux calculs de vitesse de consommation de phénols par les équations (VI.2) pour l'AF et (VI.3) pour l'AS, le ralentissement prévisible est compris entre 30 et 50 % (le ralentissement est d'autant plus fort pour la consommation d'un phénol si l'autre phénol est ajouté en quantité importante). Il apparaît ainsi qu'expérimentalement, le ralentissement de la consommation en AF est plus élevé que ne le prévoit l'équation (VI.2), alors que celui de l'AS est plus faible que ne le prévoit l'équation (VI.3). Ces résultats semblent mettre en évidence des réactions chimiques, simultanées à la réaction enzymatique, probablement des réactions secondaires d'oxydation couplée (non enzymatiques) entre les semi-quinones produites enzymatiquement et les phénols résiduels. Dans notre cas, on peut penser que ce sont les semi-quinones d'AF produites par la laccase qui oxydent l'AS et simultanément redonnent de l'AF. De tels phénomènes d'oxydation couplée ont déjà été observés par

## Résultats et Discussions

**Tableau 60. Quantités d'O<sub>2</sub> consommées (nmoles) par la laccase PC dans les mélanges AF-AS à différentes concentrations en fonction du temps (pH = 4 à 30 °C)**

| AS (mM)     | 0    |      | 0,058 |      |      | 0,1 |      |      |
|-------------|------|------|-------|------|------|-----|------|------|
| AF          | 0,16 | 0,27 | 0     | 0,16 | 0,27 | 0   | 0,16 | 0,27 |
| t =<br>25 s | 23   | 27   | 12    | 23   | 24   | 24  | 24   | 25   |
| t =<br>40 s | 40   | 44   | 25    | 42   | 38   | 35  | 40   | 39   |
| t =<br>60 s | 59   | 63   | 25    | 58   | 59   | 54  | 60   | 60   |

**Tableau 61. Valeurs moyennes (et écart type) des stœchiométries phénols disparus/oxygène consommé) pour l'ensemble des extraits (8 milieux × 3 durées = 24 valeurs), les extraits du milieu « mélange » (4 milieux × 3 durées = 12 valeurs) et les extraits des milieux « purs » (4 milieu × 3 durées = 12 valeurs)**

|                             |                     | Phénols totaux /O <sub>2</sub> | AF / O <sub>2</sub>    | AS / O <sub>2</sub>    |
|-----------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Ensemble des milieux</b> | <i>Expérimental</i> | 4,7 ± 1,5                      |                        |                        |
|                             | <i>Théorique</i>    | 4                              |                        |                        |
| <b>Milieux « purs »</b>     | <i>Expérimental</i> |                                | 5,9 ± 1,5              | 4,3 ± 1,8              |
|                             | <i>Théorique</i>    |                                | 4                      | 4                      |
| <b>Milieux « mélange »</b>  | <i>Expérimental</i> | 4,4 ± 1,0                      | 1,6 ± 0,6 <sup>a</sup> | 2,8 ± 1,0 <sup>b</sup> |
|                             | <i>Théorique</i>    | 4                              | 2,1 <sup>a</sup>       | 1,9 <sup>b</sup>       |

<sup>a</sup> Valeurs calculées en attribuant la totalité de l'oxygène consommé à la disparition de l'acide férulique.

<sup>b</sup> Valeurs calculées en attribuant la totalité de l'oxygène consommé à la disparition de l'acide sinapique.

Richard-Forget *et al.* (1992) lors de l'oxydation de mélange d'acide chlorogénique et d'épicatéchine catalysée par la polyphénoloxydase isolée de la pomme.

Parallèlement, la consommation d'oxygène associée à ces pertes en AF et AS a été déterminée à partir des enregistrements polarographiques. Les résultats obtenus pour les 3 durées cinétiques de consommation sont donnés dans le tableau 60 pour l'ensemble des mélanges étudiés. Si l'on excepte le cas de l'AS seul à 0,058 mM, l'ensemble des consommations d'oxygène est relativement peu affecté par les variations de concentrations en AF et AS dans le domaine expérimental. Ceci est en accord avec les résultats illustrés dans la figure 140 représentatifs du modèle théorique issu de l'équation (VI.1). Dans le cas de l'AS seul à 0,058 mM, l'arrêt de consommation d'oxygène avant 40 s est dû à la disparition complète de substrat de l'enzyme après 25 s de réaction comme le montre la figure 142.

A partir des quantités de phénols disparus calculées à l'aide des données illustrées dans les figures 141 et 142 et les quantités consommées du tableau 60, les ratios phénols disparus / oxygène consommé pour les 24 extraits analysés ont été déterminés (3 durées de réactions  $\times$  8 milieux). Les valeurs moyennes (avec l'écart type) de ces stœchiométries sont données dans le tableau 61 pour l'ensemble des extraits (24 valeurs) en distinguant les milieux « mélanges » où les deux phénols sont présents (12 valeurs) de ceux « purs » où ils sont seuls (12 valeurs). Ces valeurs moyennes sont comparées aux valeurs théoriques calculées à l'aide des équations (VI.1), (VI.2) et (VI.3) pour les milieux « mélange ». La stœchiométrie théorique de la réaction enzymatique est de 4 moles de phénols disparus pour une mole d'oxygène consommé (2 moles de semi-quinones sont produites à partir de 2 moles de phénol pour  $\frac{1}{2}$  mole d'oxygène consommée avec formation d'une mole d'eau).

L'analyse du tableau 61 montre que, pour l'ensemble des milieux, la valeur moyenne des stœchiométries, égale à 4,7, est supérieure à la valeur théorique. Cet écart est probablement lié à la présence de réactions secondaires consommant les phénols sans faire intervenir l'oxygène, vraisemblablement via les semi-quinones. L'écart à la théorie est encore plus marqué pour l'AF et moins marqué pour l'AS dans les milieux « purs ». Dans les milieux « mélange », lorsque l'on considère chacun des phénols, la stœchiométrie observée pour l'AF (1,6) est inférieure à la valeurs théorique (2,1) alors qu'avec l'AS, elle est nettement plus élevée (2,8) que la valeur théorique (1,9).

Ces observations s'expliquent si l'on admet une moins forte réactivité des semi-quinones issues de l'AS comparée à celle des semi-quinones issues de l'AF. Ces dernières, en présence de l'AF seul, le dégradent par des voies non enzymatiques ne faisant pas intervenir d'oxygène ce qui augmente la stœchiométrie phénols disparus / oxygène consommé. En

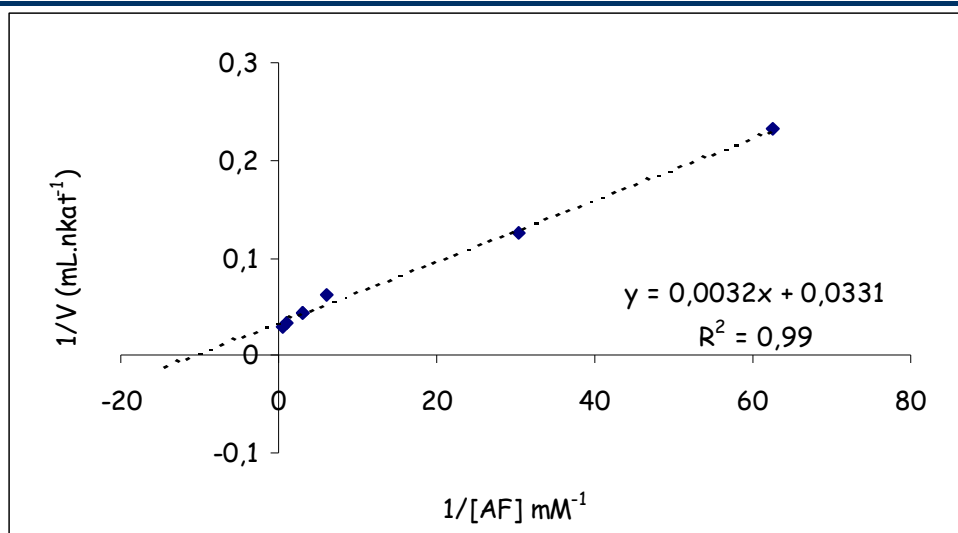


Figure 143. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de la L-DOPA par polarographie (représentation de Lineweaver et Burke). Conditions : pH = 5,6 ; 30 °C.

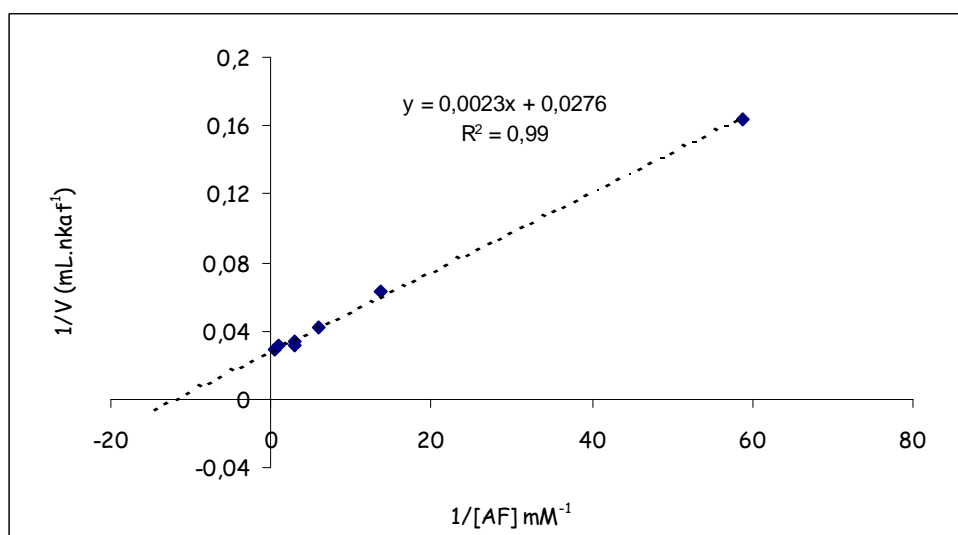


Figure 144. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de l'AF par polarographie (représentation de lineweaver et Burke). Conditions d'expériences : pH = 5,6 ; 30 °C.

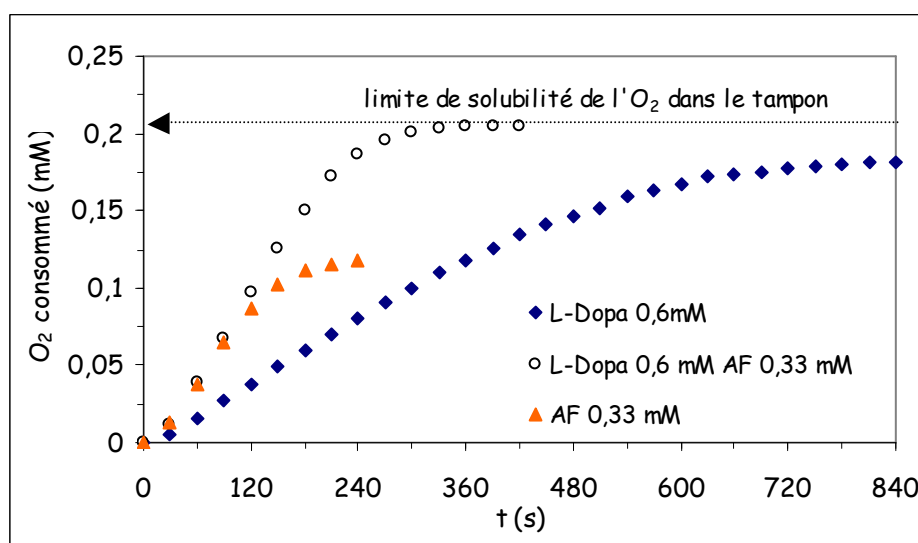


Figure 145. Consommation d'O<sub>2</sub> mesurée par polarographie lors de l'oxydation d'AF (0,3 mM) et de L-DOPA (0,6 mM) seuls ou en mélanges (à pH = 5,6 à 30 °C) dans 1,4 mL de solution

présence d'AS, ces semi-quinones seraient en partie régénérées en AF tout en dégradant l'AS expliquant du même coup la stœchiométrie plus élevée de l'AS et le fort ralentissement de la consommation d'AF dans le mélange observé dans la figure 142.

### 4.5.4.2 Mélanges AF-DOPA (pH 5,6 à 30 °C)

Au préalable, les constantes cinétiques de l'enzyme ont été déterminées vis-à-vis de chacun des substrats phénoliques dans les conditions proches des précédentes (pH 5,6 à 30 °C) avec une quantité d'enzyme égale à 1,2 nkat (mesuré avec 2 mM d'AF à H 5,6) dans un volume de 1,4 mL. Les mesures ont été réalisées à pH 5,6 afin de se rapprocher des conditions existantes dans la pâte. La figure 143 donne la représentation en double inverse vis-à-vis de la L-DOPA. Les  $K_m$  et  $V_m$  déterminés sont de 0,44 mM et 18,3 nkat.mL<sup>-1</sup>, respectivement. Pour l'AF, les constantes déterminées à partir de la représentation en double inverse (figure 144) sont de 0,097 mM pour le  $K_m$  et 30,2 nkat.mL<sup>-1</sup> pour le  $V_m$ . La valeur du  $K_m$  obtenue est cohérente avec celle déterminée dans les mêmes conditions expérimentales sur le premier lot de PC utilisé (tableau 55).

Une première étude a été réalisée avec les milieux à pH 5,6 contenant l'AF (0,33 mM) et la L-DOPA (0,6 mM), seul ou en mélanges (figure 145) auxquels sont ajoutés 1,2 nkat d'enzyme (mesurés avec 2 mM d'AF à pH 5,6). L'activité mesurée pour la L-DOPA seule est de 0,4 nkat. En présence d'AF (seul ou en présence de L-DOPA 0,6 mM dans le milieu), la vitesse de réaction est plus élevée soit 0,97 nkat. Pour les deux substrats seuls, les quantités totales d'O<sub>2</sub> consommées sont respectivement de 0,118 mM pour l'AF et 0,182 mM pour la L-DOPA. Dans le cas de l'AF seul, après 4 min de réaction, la consommation d'O<sub>2</sub> atteint un plateau correspondant probablement à la consommation de tout l'AF, ce qui donne une stœchiométrie de 2,8, valeur inférieure aux données théoriques de 4 moles d'AF pour une mole d'O<sub>2</sub> consommée (Brown, 1967). Ce résultat indique qu'une quantité d'O<sub>2</sub> consommée plus importante est mesurée, probablement due à l'activité de la laccase vis-à-vis des dimères formés. Dans le cas de la L-DOPA, la quantité totale d'O<sub>2</sub> consommée après environ 15 min est de 0,182 mM, ce qui donne une stœchiométrie de 3,3. Ces données sont également en contradiction avec la théorie. Il est cependant probable que les composés primaires de l'oxydation de la L-DOPA par la laccase participent moins à la consommation d'oxygène.

Lorsque les deux phénols sont présents dans le milieu, tout l'O<sub>2</sub> présent dans le milieu est consommé et de façon rapide (activité égale à celle mesurée en présence d'AF seul). Ceci est cohérent avec le rôle de médiateur de l'AF, dont les espèces radicalaires oxydent la L-DOPA en régénérant l'AF de départ (Figuerola-Espinoza et Rouau, 1999).



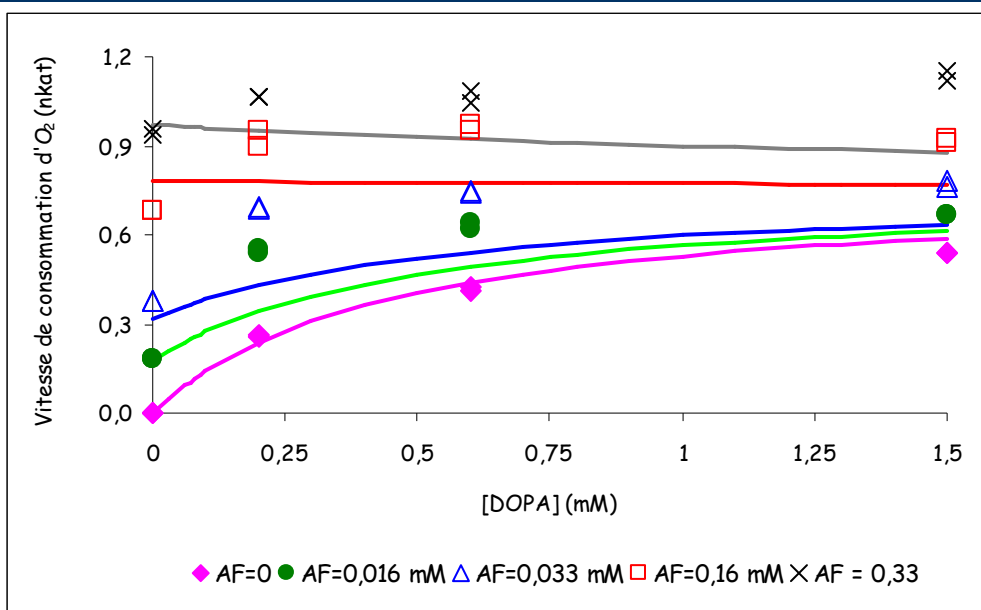


Figure 146. Vitesse de consommation d'oxygène (à pH = 5,6 et à 30 °C) dans les mélanges AF-DOPA en présence de la laccase PC.

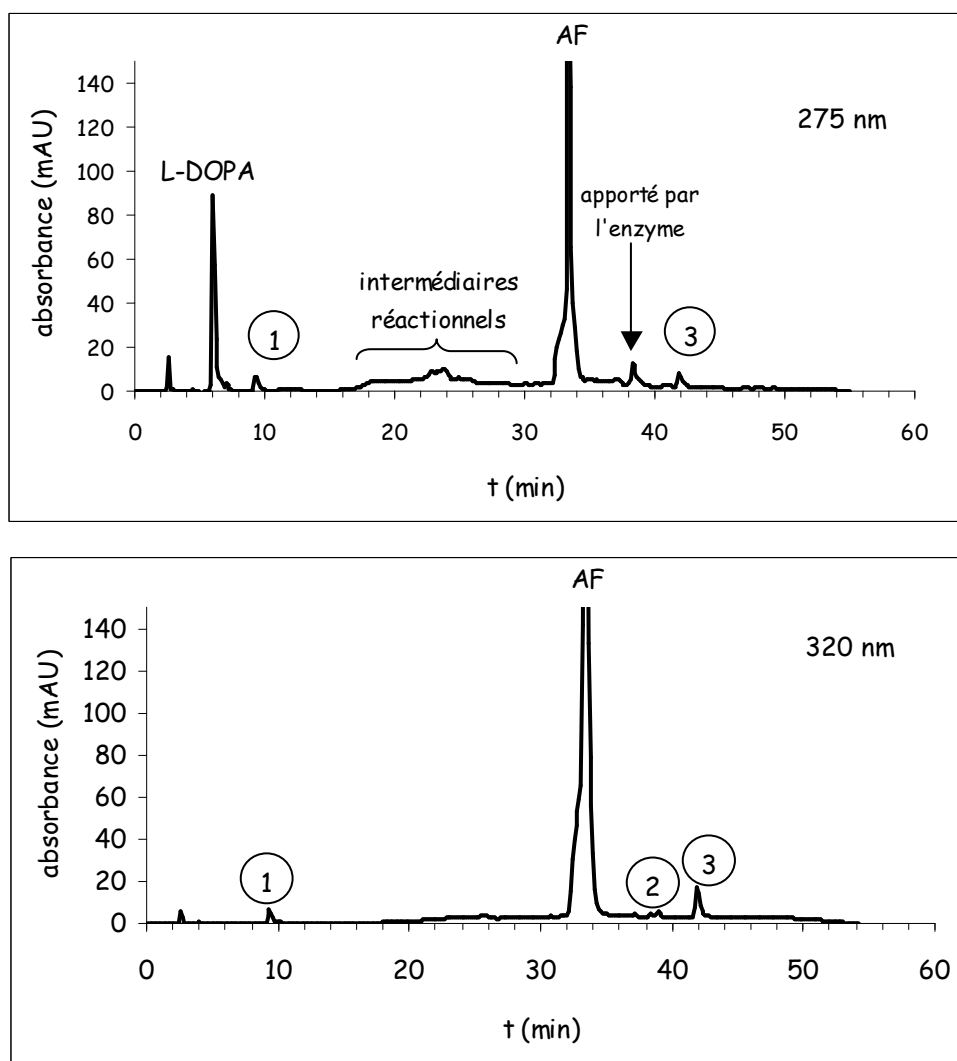


Figure 147. Profils d'élution obtenus lors de l'oxydation par PC d'un mélange DOPA-AF suivis à 275 nm (haut) et 320 nm (bas).

## Résultats et Discussions

---

Une étude plus complète a ensuite été réalisée avec des mélanges AF/DOPA contenant 0, 0,016, 0,033, 0,16 et 0,33 mM en AF et 0, 0,2, 0,575 et 1,5 mM en L-DOPA toujours à pH 5,6 avec une quantité d'enzyme égale à 1,2 nkat (mesurée avec 2 mM d'AF à pH 5,6). La figure 146 montre les résultats obtenus sur la vitesse de consommation d'oxygène dans ces différents mélanges. Plus la quantité d'AF ajouté est importante, plus la vitesse de consommation s'accroît. Comme dans le cas du mélange AF-AS, les effets sont d'autant plus marqués que les concentrations en DOPA sont faibles, c'est-à-dire que l'enzyme n'est pas saturée en substrat. En revanche, l'ajout de quantité croissante de DOPA n'augmente que faiblement la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> quand les deux substrats sont présents dans le milieu (au-delà de 0,2 mM en L-DOPA). De plus, lorsqu'on applique l'équation VI.1, les valeurs expérimentales des vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> sont toujours supérieures à celles prédites par le modèle, faisant apparaître systématiquement un phénomène d'accélération de la consommation d'O<sub>2</sub> dans les mélanges. Pour les faibles concentrations en AF seul, la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> ralentit très rapidement (épuisement du substrat) ce qui rend difficile l'estimation des vitesses initiales. Lors de l'ajout de L-DOPA à l'AF, le ralentissement de la consommation d'O<sub>2</sub> est beaucoup moins marqué. La mesure des consommations de phénol par HPLC devrait permettre d'expliquer ce phénomène.

La mesure de la disparition de L-DOPA dans le milieu est réalisé à 275 nm et celle de l'AF à 320 nm. Les spectres des produits formés obtenus sur un détecteur à barrette de diodes ont permis l'identification de ces derniers. L'élution se déroule pendant 60 min dans les conditions mises au point au laboratoire par Rakotozafy (*communication personnelle*) et précisées ci-après. Pendant les 20 premières min d'élution, un gradient linéaire permet de faire varier le rapport tampon phosphate pH 2,5/acétonitrile de 98/2 à 70/30 pour éluer progressivement la DOPA et ses produits d'oxydation, puis l'AF et ses produits d'oxydation. Un chromatogramme type obtenu est présenté dans la figure 147 correspondant à un mélange DOPA 0,6 mM – AF 0,33 mM, 180 s après l'ajout de 1,2 nkat de laccase PC. Dans ces conditions, la L-DOPA a un temps de rétention de 6 min et l'AF de 33 min. 3 produits d'oxydation (n°1 – 2 – 3) apparaissent, respectivement à 9, 38 et 41 min. Un pic apparaît vers 37 min dû à l'enzyme (vérifié par injection de l'enzyme seule). Entre 17 et 30 min, un ensemble de molécules mal séparées sont mises en évidence. L'analyse des spectres de ces dernières montrent des caractéristiques communes aux différentes espèces en présence, substrats et certains produits d'oxydation. Il s'agit probablement d'intermédiaire de réactions non stables. Les produits 1, 2 et 3 ont été identifiés par leur spectre d'absorbance

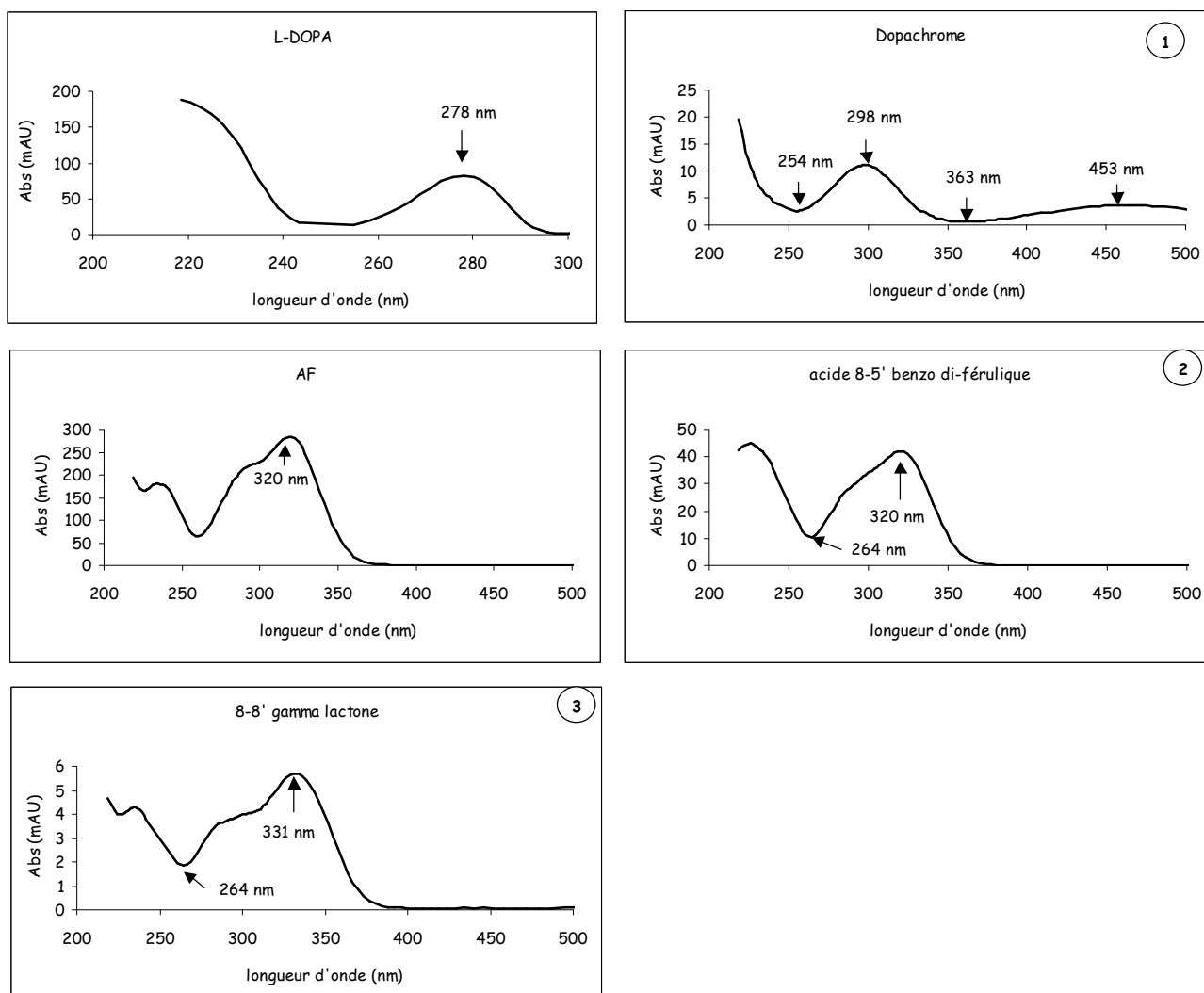


Figure 148. Spectres d'absorption de la L-DOPA et de l'AF ainsi que de leurs produits d'oxydation par la laccase PC.

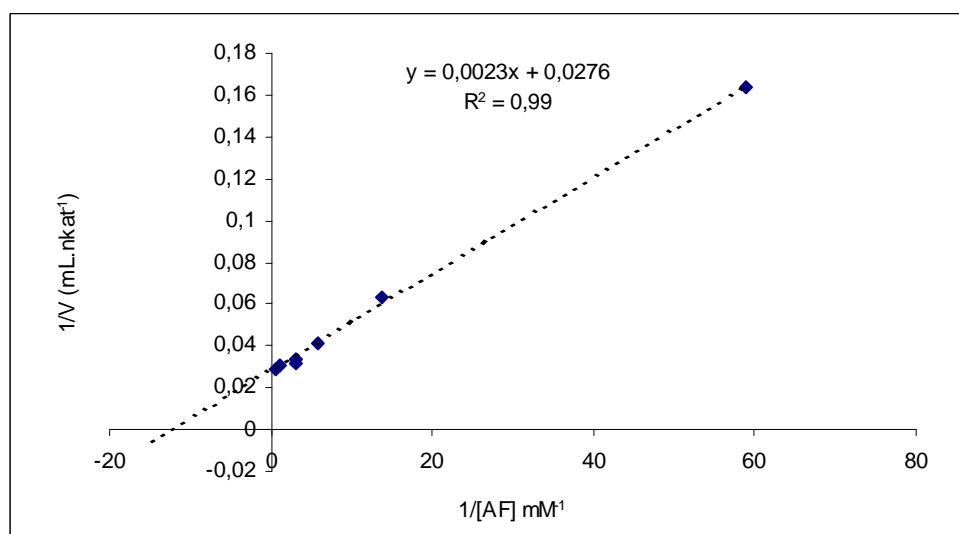


Figure 150. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de l'AS par polarographie (représentation de Lineweaver et Burke). Conditions d'expériences : pH = 5,6 ; 30 °C.

correspondant au dopachrome (produit d'oxydation de la L-DOPA) et aux deux dimères d'AF, l'acide 8-5' benzodiférulique et la 8-8' gamma lactone (figure 148).

La composition du mélange DOPA 0,2 mM –AF 0,33 mM a été étudiée après 60, 120, 180 et 240 s de réaction enzymatique. L'oxydation par 1,2 nkat de laccase PC de L-DOPA 0,6 mM conduit à une disparition lente et proportionnelle au temps de celle-ci. Après 3 min de réaction, seulement 10 % de la quantité initiale a disparu (figure 149). Environ la moitié de la L-DOPA de départ est oxydée après 30 min de réaction (donnée non montrée). Le fait d'ajouter de l'AF (0,33 mM) dans le milieu provoque une forte accélération de la diminution de DOPA. Après 3 min, la quasi-totalité de la DOPA est consommée. Dans des conditions équivalentes, après 3 min de réaction avec 0,33 mM d'AF seul, une consommation quasi-totale de l'AF est observée alors que l'ajout de 0,2 mM en DOPA ralentit fortement la consommation de l'AF puisqu'après 3 min, seulement 30 % d'AF sont consommés.

On observe un effet accélérateur de la consommation de la DOPA lorsque l'AF est ajouté et simultanément un effet retardateur de la consommation d'AF lorsque la DOPA est ajoutée. Ceci peut s'expliquer par une réaction non enzymatique d'oxydation de la L-DOPA par la semiquinone d'AF. Dans ce cas, l'AF joue un rôle de médiateur d'oxydation.

L'analyse de différents mélanges AF/DOPA a montré qu'à concentration constante en AF, des concentrations croissantes en DOPA ralentissent la vitesse de consommation d'AF alors qu'à concentration constante en DOPA, des concentrations croissantes d'AF augmentent la vitesse de consommation de DOPA. Enfin, dans nos conditions d'expériences, aucun produit de couplage entre les semiquinones de DOPA et d'AF n'a été détecté quel que soit le temps de cinétique.

### **4.5.4.3 Mélanges AS-DOPA (pH 5,6 à 30 °C)**

Une expérimentation similaire a été réalisée avec des mélanges AS/DOPA. Comme dans le paragraphe précédent, les paramètres cinétiques de l'enzyme PC vis-à-vis des substrats seuls ont été déterminés. Le  $K_m$  et le  $V_m$  vis-à-vis de la L-DOPA sont identiques aux précédents à savoir 0,44 mM et 18,3 nkat.mL<sup>-1</sup> respectivement. Vis-à-vis de l'AS, ils sont fournis par la représentation en double inverse de la figure 150. Les valeurs déterminées sont 0,08 mM pour le  $K_m$  et 36,3 nkat.mL<sup>-1</sup> pour le  $V_m$ , respectivement.

Dans la figure 151, dans le cas du mélange AS-DOPA, l'effet de l'ajout d'AS à des solutions de DOPA provoque une accélération de la consommation d'O<sub>2</sub>, donnant des vitesses instantanées de consommations d'O<sub>2</sub> mesurées supérieures à celles prévues par la théorie (équation VI.1) appliquée à ce mélange. Ces résultats sont identiques à ceux précédents

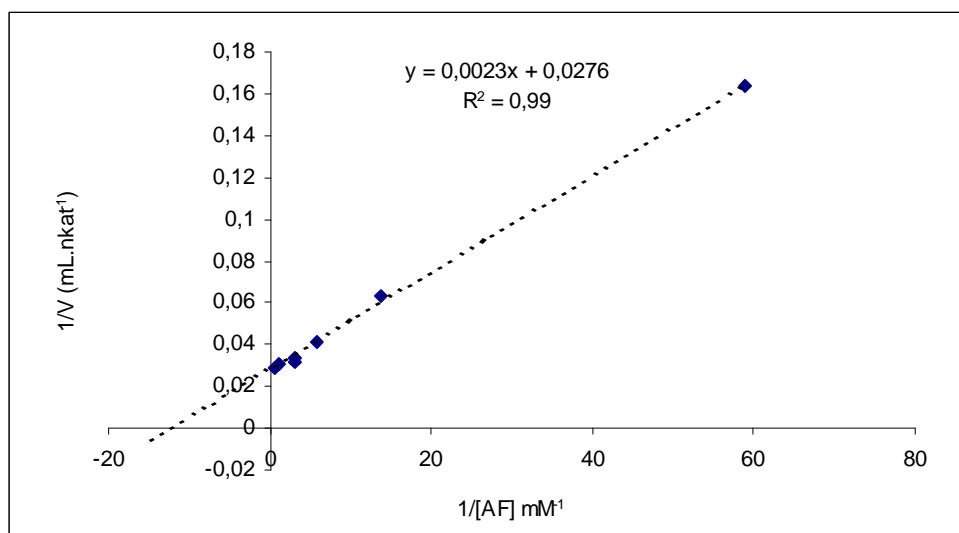


Figure 150. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de l'AS par polarographie (représentation de Lineweaver et Burke). Conditions d'expériences : pH = 5,6 ; 30 °C.

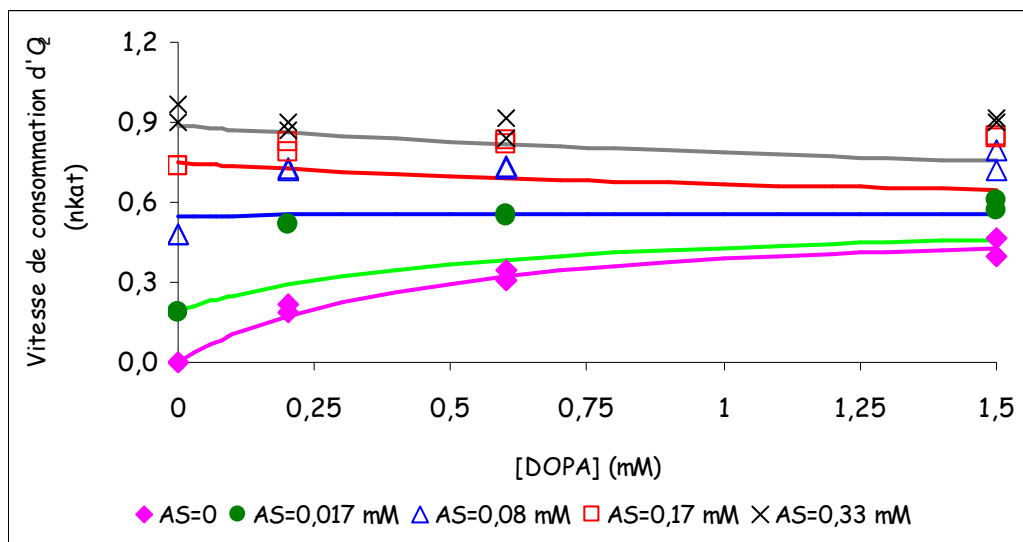


Figure 151. Vitesse de consommation d'oxygène (à pH = 5,6 et à 30 °C) dans les mélanges AS-DOPA en présence de la laccase PC.

trouvés lors de l'ajout d'AF à une solution de L-DOPA dans le milieu en présence de la laccase PC. L'ajout d'une petite quantité d'AS à des solutions de DOPA en présence de laccase PC entraîne une accélération importante de la consommation d'O<sub>2</sub> initiale. Dans ces milieux (à pH = 5,6 et à 30 °C), l'activité oxydante semble devenir très intense très rapidement. Ce phénomène est à rapprocher de celui observé dans les mélanges AF/DOPA. Il est vraisemblable que là aussi, l'AS joue un rôle d'accélérateur de la consommation de L-DOPA alors que sa consommation propre est ralentie par l'ajout de DOPA. Comme pour l'AF, l'AS jouerait un rôle de médiateur pour l'oxydation de la L-DOPA par la laccase PC.

#### **4.5.4.4 Mélanges tyrosine-AF (pH 5,6 à 30 °C)**

Des essais ont été réalisés pour étudier l'oxydation de mélanges Tyrosine-AF. Par polarographie, une faible consommation d'O<sub>2</sub> est observée lors de l'ajout de laccase PC à une solution de tyrosine. De même, par spectrophotométrie, l'ajout de laccase dans le milieu provoque une variation lente du spectre de la tyrosine (données non montrées). Cependant, pour observer l'oxydation de tyrosine par la PC dans un temps raisonnable, il est nécessaire d'utiliser un échantillon concentré d'enzyme et une forte concentration de tyrosine (2,76 mM).

Ainsi, la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> à pH 5,6 par la même quantité de laccase PC est plus de 1000 fois plus faible en présence de tyrosine (2,76 mM) qu'en présence d'AF (2 mM). Selon Rakotozafy (*communication personnelle*), les produits d'oxydation de la tyrosine par PC sont des dimères, dityrosine et isodityrosine, déjà connus (Tilley *et al.*, 2001). Par ailleurs, toujours selon Rakotozafy (*communication personnelle*), en présence d'AF, les radicaux tyrosyl générés enzymatiquement accélèrent la formation des dimères d'AF avec un ralentissement de la formation de dimères de tyrosine (par rapport à un milieu ne contenant qu'un seul phénol) sans formation détectable d'hétérodimères d'acide déhydrofêrulique-tyrosine.

Dès lors dans nos conditions expérimentales, en milieu modèle et à pH 5,6, les radicaux tyrosyl générés par la laccase semblent être les plus oxydants parmi les substrats étudiés. Cependant la vitesse d'apparition est très par rapport à celle des radicaux féruloyl qui sont eux-mêmes très réactifs puisqu'ils forment des dimères et/ou oxydent d'autres composés tels que l'AF esterifié, l'acide sinapique, la L-DOPA, l'acide ascorbique et les thiols (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998c ; Garcia *et al.*, 2002a).

Il semble difficile de former des liaisons covalentes entre tyrosine des protéines et AF des pentosanes, les essais conduits dans ce sens avec les laccases ont été infructueux

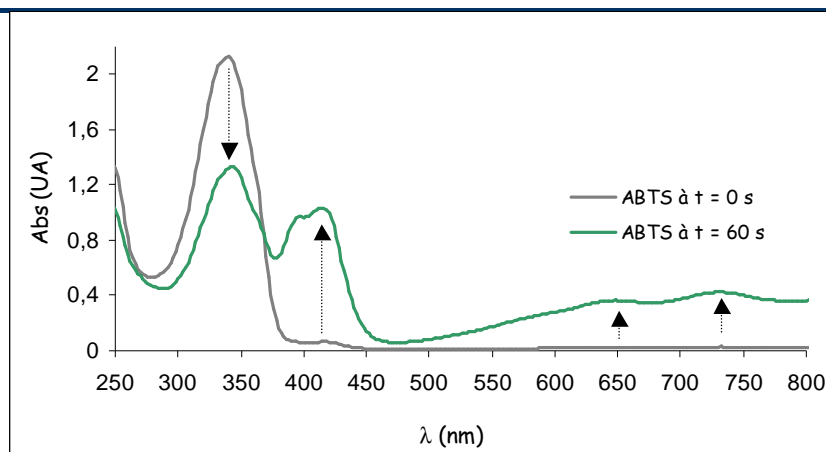


Figure 152. Spectre d'absorption de l'ABTS (0,05 mM) oxydé par la laccase PC à t = 60 s (pH = 5,6 ; 30 °C). En gris, spectre de l'ABTS initial.

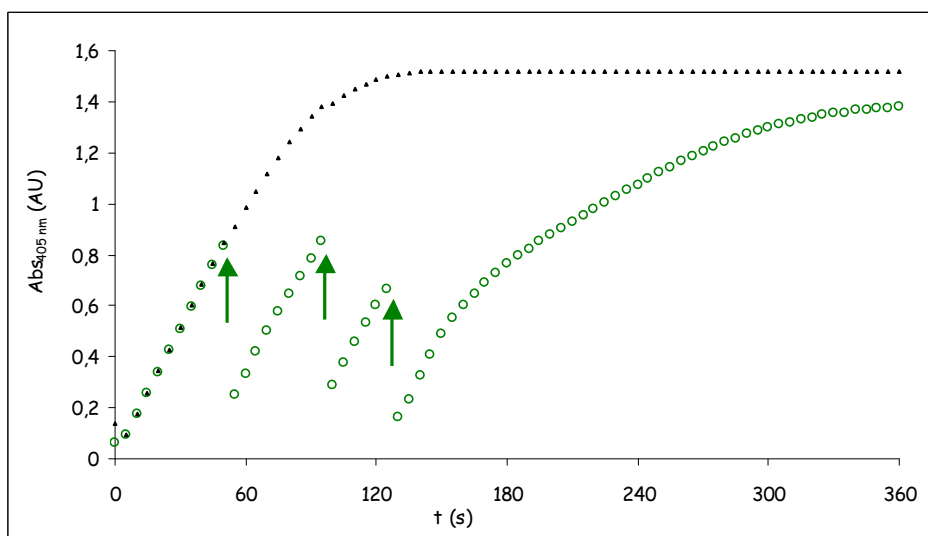


Figure 153. Evolution de l'absorbance à 405 nm lors d'injections successives de 20 nmoles d'AF (t = 60, 100, 120 s) à une solution d'ABTS (0,05 mM) oxydée par la laccase PC à pH 5,6 à 30 °C

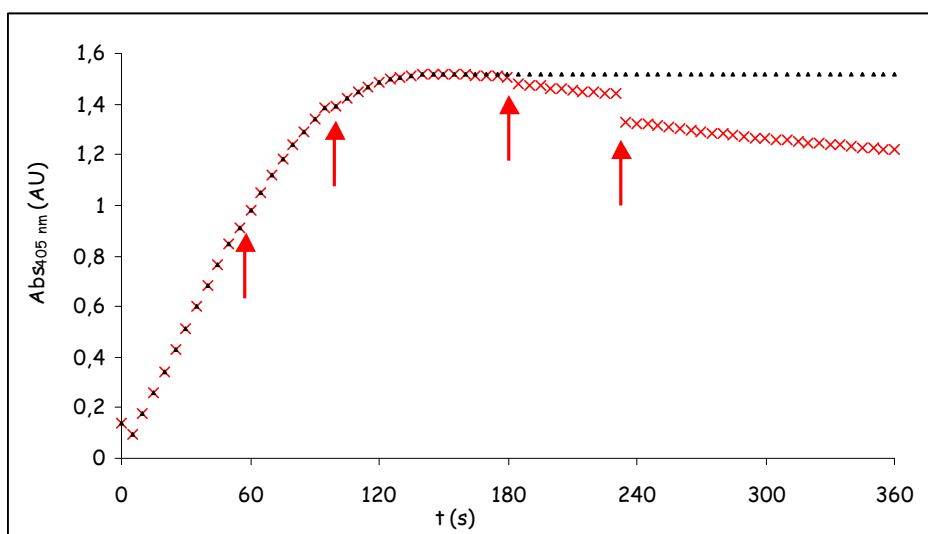


Figure 154. Evolution de l'absorbance à 405 nm lors d'injections successives de 28 nmoles de tyrosine (à t = 60, 100, 180 et 240 s) à une solution d'ABTS (0,05 mM) oxydée par la laccase PC à pH 5,6 à 30 °C

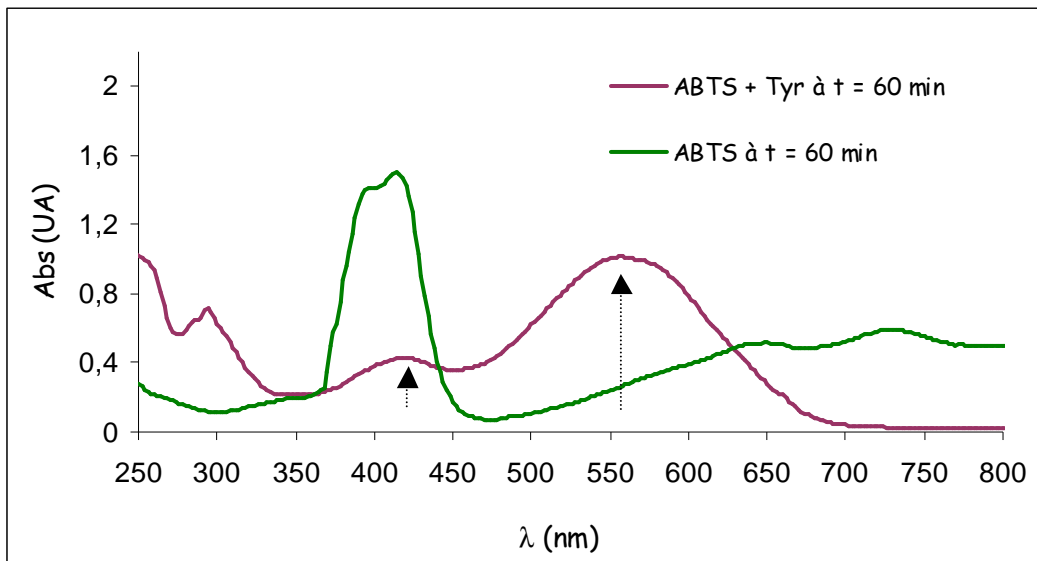
(Figueroa-Espinoza *et al.*, 1999a). L'explication suivante peut être avancée. En effet, pour augmenter la probabilité de réaction entre radicaux tyrosyls et féruloyls, il faut les former avec des vitesses de réactions enzymatiques proches sinon identiques. Ceci est difficile à mettre en œuvre dans les pâtes de farine avec les laccases dont nous disposons puisque les concentrations en composés phénoliques (tyrosine et acide férulique) ne peuvent être modifiées. Notons cependant que Piber et Koehler (2005) ont détecté la présence d'hétérodimères d'acide déhydroférulique-tyrosine dans la farine de blé et montré qu'il s'en formait de petites quantités pendant le pétrissage. Par ailleurs, Oudgenoeg *et al.* (2001 et 2002) ont aussi mis en évidence la formation de ces hétérodimères dans les milieux modèles à pH 8 en utilisant la peroxydase de raifort en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, d'acide férulique et d'un tripeptide Gly-Tyr-Gly à condition d'utiliser un rapport de concentration [Gly-Tyr-Gly]/[AF] égal à 40.

### **4.5.4.5 Mélanges AF-ABTS et Tyrosine-ABTS (pH 5,6 à 30 °C)**

L'ABTS est le substrat des laccases connu pour être un bon médiateur d'oxydation. Lors de son oxydation par la laccase à pH = 5,6 et à 30 °C, il se forme un produit bleu-vert correspondant à l'apparition d'un radical cationique stable ABTS<sup>°</sup> (figure 152). Dans un cuve de 3 mL, l'oxydation d'ABTS 0,05 mM par la laccase PC est mesurée à 405 nm. Plusieurs expériences ont été menées en ajoutant à une solution d'ABTS oxydée par PC, 20 nmoles d'AF (20 µL d'une solution à 1 mM préparé dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,6) à intervalle de temps réguliers (60, 100 et 120 s) (figure 153), puis la même expérience avec 28 nmoles de tyrosine (20 µL d'une solution à 1,4 mM) ajoutés à 60, 120, 180 et 240 s (figure 154).

Pour ces trois expériences, l'augmentation de volume provoquée par l'ajout de solutions n'excède pas 2,7 % du volume initial et la dilution engendrée est négligeable. Dans toutes les expériences, la vitesse initiale d'oxydation de l'ABTS est de 1,35 nkat en prenant un coefficient d'extinction molaire pour l'ABTS de 36000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 405 nm. Sur la courbe témoin, après 120 s de réaction, un plateau est atteint (absorbance d'environ 1,5) correspondant à l'oxydation de l'ensemble des molécules d'ABTS en radical ABTS<sup>°</sup>. A chaque ajout de 20 nmoles d'AF, une chute d'absorbance à 405 nm voisine de 0,6 est observée soit la réduction d'environ 50 nmoles d'ABTS<sup>°</sup> en ABTS. Si l'on considère que la totalité de l'AF est oxydé, cela conduit à une stoechiométrie ABTS<sup>°</sup>/AF proche de 2,5. Cette valeur est probablement sous estimée puisque la laccase continue d'agir sur l'ABTS (augmentation de l'absorbance à 405 nm) et consomme une partie de l'AF ajouté. Après 180 s





**Figure 155.** Spectre d'absorbance caractéristique obtenu lors de l'oxydation d'ABTS en présence de tyrosine après 60 min de réaction.

de réactions, la vitesse d'apparition du radical  $ABTS^\circ$  est nettement ralentie. A cet instant, dans le milieu, l'AF ajouté et les dimères d'AF produits par oxydation couplée sont également substrats de l'enzyme et donc susceptibles d'être consommés.

Lorsqu'on ajoute la tyrosine à la solution d'ABTS oxydée par la laccase PC, aucun effet n'est observé sur l'évolution de l'absorbance à 405 nm par rapport au témoin jusqu'à 180 s de réaction (figure 154). Ce n'est que lors de l'ajout de 28 nmoles de tyrosine après 180 s de réaction qu'une diminution lente de l'absorbance à 405 nm est observée. Celle-ci est accentuée par un deuxième ajout de 28 nmoles de tyrosine après 240 s de réaction. Ainsi, il apparaît que dans la phase initiale de la réaction, les radicaux  $ABTS^\circ$  n'oxyderaient pas la tyrosine ou le feraient trop lentement pour être détectables. En revanche après 180 s (lorsque tout l'ABTS a été transformé en  $ABTS^\circ$ ), il est possible que les produits d'oxydation enzymatique de la tyrosine réagissent avec l' $ABTS^\circ$ . Effectivement, lorsqu'on laisse la réaction se dérouler pendant 60 min, une coloration violette apparaît dont le spectre d'absorbance présente 2 maxima à 550 nm et 405 nm (figure 155)

### 4.5.5 Effet de la laccase en milieu pâteux

Les laccases catalysent les réactions d'oxydation des mono-, *ortho* et diphénols, et sont donc potentiellement intéressantes pour leur action oxydante au sein de la pâte. Une étude de l'effet dose a été réalisée (1,5 – 6 – 12,5 et 25 nkat.g<sup>-1</sup> ms mesuré avec l'AF 2 mM à pH 4). Dès la dose de 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms, la pâte devient collante et difficilement manipulable au-delà de 25 nkat.g<sup>-1</sup> ms. Nous pouvons également ajouter que lorsque la dose de laccase augmente, la pâte devient de moins en moins consistante et de plus en plus extensible, la dose de 25 nkat.g<sup>-1</sup> ms conduit à une pâte très extensible.

#### 4.5.5.1 Sur le volume du pain

Des essais préliminaires ont été réalisés au sein du fournil de la société Puratos (test de panification « pistolet » normalisé pour la fabrication de petits pains de 50 g). 2 doses de laccase PC (2 et 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms) ont été utilisées seules, ou en présence d'acide ascorbique. L'effet sur le volume spécifique des pains a alors été comparé avec des cocktails enzymatiques commerciaux (hémi-cellulases et amylase). Les volumes spécifiques moyens sont calculés en prenant la moyenne des volumes sur 4 pains pesés. Les coefficients de variation sont inférieurs à 5 %. L'ajout de laccase provoque une légère augmentation du volume spécifique de 4 et 7 % respectivement (tableau 62), l'accroissement de volume

## Résultats et Discussions

Tableau 62. Comparaison de l'ajout de laccase PC sur le pourcentage d'augmentation du volume spécifique de pains l'effet d'améliorants classiques : 1, Témoin. 2, acide ascorbique (AA) 100 ppm. 3, laccase PC 2 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 4, laccase PC 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 5, AA 100 ppm + PC 2 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 6, AA 100 ppm + PC 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 7, AA 100 ppm + amylose (AMY) 10 ppm. 8, AA 100 ppm + hemicellulose (HC) 50 ppm 9, AA 100 ppm + AMY 10 ppm + HC 50 ppm.

| Essai                                 |   |   |   |   |   |
|---------------------------------------|---|---|---|---|---|
| Augmentation du Volume spécifique (%) | 7 | 2 | 5 | 6 | 4 |

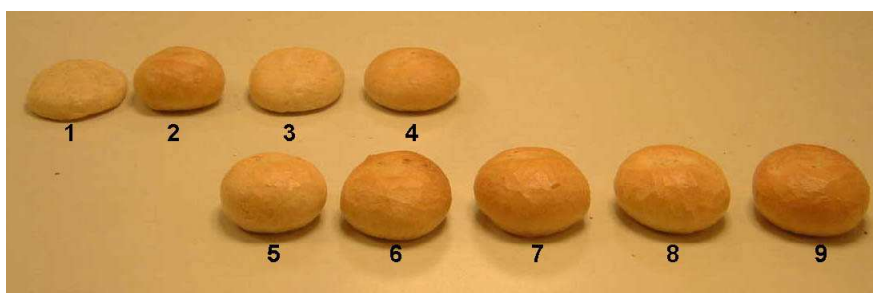


Figure 156. Photographies des pains lors des essais de panification. Comparaison de l'effet de laccase PC avec des améliorants classiques. : 1, Témoin. 2, acide ascorbique (AA) 100 ppm. 3, laccase PC 2 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 4, PC6 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 5, AA 100 ppm + PC 2 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 6, AA 100 ppm + PC 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms. 7, AA 100 ppm + amylose (AMY) 10 ppm. 8, AA 100 ppm + hemicellulose (HC) 50 ppm 9, AA 100 ppm + AMY 10 ppm + HC 50 ppm.

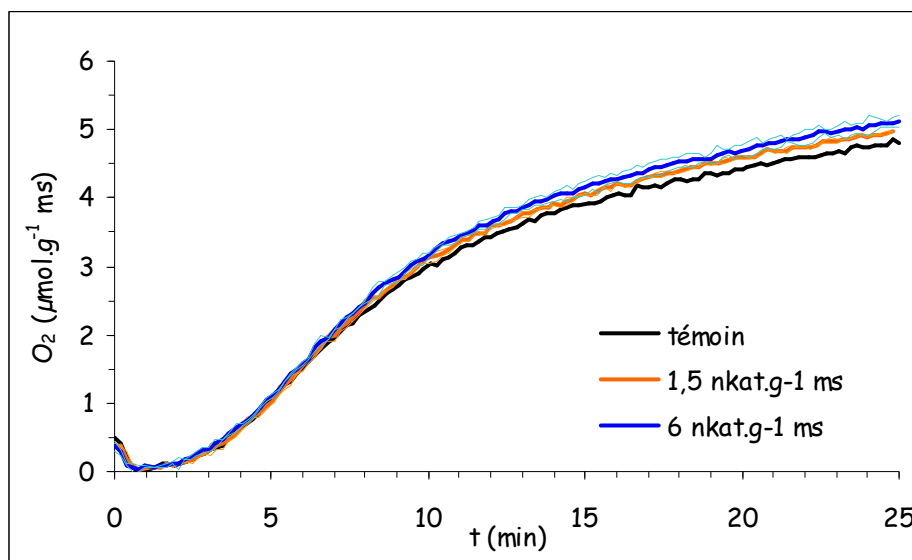


Figure 157. Effet de l'ajout de la laccase PC sur la consommation d'oxygène au sitoxygraphe pour des pâtes pétrées dans les conditions variétales (2,5 kg de farine, 1,5 kg d'eau, 45 g de NaCl)

spécifique est encore plus élevé en présence d'acide ascorbique pour la forte dose de laccase (22 % pour l'essai AA + laccase contre 17 % pour l'AA seul). En revanche, ces résultats sont nettement plus faibles comparés à ceux obtenus lors de l'ajout d'acide ascorbique avec amylase ou hémicellulase seule (35 et 36 % d'augmentation du volume spécifique) ou l'ensemble acide ascorbique-amylase-hémicellulase qui permet une augmentation de 54 % du volume spécifique.

En présence d'acide ascorbique, l'ajout de laccase à la faible dose entraîne une augmentation de volume spécifique inférieure à celle provoquée par l'ajout d'acide seul, et un volume spécifique supérieur pour la forte dose. Concernant l'aspect des pains, l'ajout de deux doses de laccases sans acide ascorbique favorise la formation de pains plus ronds que le pain témoin ne contenant aucun améliorant (figure 156). En présence d'acide ascorbique, le caractère rond favorisé par l'acide ascorbique et la laccase semble être renforcé. Un léger brunissement du pain est également observé en lien avec la dose d'enzyme incorporée dans la pâte, probablement imputable à la couleur brune de la solution enzymatique non purifiée utilisée. Ajoutée à la pâte, l'enzyme K1 provoque également une augmentation de volume du pain (Arnaut *et al.*, 2006). Ces résultats prometteurs ont conduit à la poursuite des investigations sur l'action des laccases au sein de la pâte.

### **4.5.5.2 Sur la consommation d'oxygène.**

Au bioréacteur, l'ajout d'une dose de  $6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$  (environ  $2 \mu\text{kat}$  dans la cuve du pétrin) provoque une surconsommation d'oxygène de 15 % après 25 min de pétrissage (figure 133) par rapport à une farine témoin (BF14). Dans ce cas, la surconsommation est visible dès 10 min de pétrissage. Additionnée à une pâte pétrie au sitoxygraphe (composée de farine CNS), la laccase PC provoque aussi une augmentation de la consommation d' $\text{O}_2$  (figure 157). Un effet de la dose ajoutée est visible et la surconsommation totale est d'environ 0,1 et 0,3  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  pour les doses 1,5 et  $6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$  ajoutés. La surconsommation apparaît après 8 à 10 min de pétrissage au sitoxygraphe. Lorsque les doses d'enzyme sont augmentées (de 12,5 à  $50 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ), aucune surconsommation supplémentaire n'est observée. En revanche, au-delà de  $6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ , la pâte devient filante, extensible et collante à mesure que la dose d'enzyme augmente, rendant la manipulation de la pâte délicate à partir de  $25 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ . L'ajout de laccase en excès semble donc préjudiciable aux qualités des pâtes.

## Résultats et Discussions

**Tableau 63. Effet de la dose de laccase PC sur les paramètres (W, G, P) déterminés lors du test à l'alvéographe.**

| Dose d'enzyme (nkat.g <sup>-1</sup> ms) | 0   | 1,5  | 6    | 12   | 25 | 35   |
|---|-----|------|------|------|----|------|
| W                                       | 196 | 198  | 177  | 117  | 63 | 30   |
| G                                       | 28  | 28,4 | 27,2 | 27,3 | 24 | 17,6 |
| P                                       | 53  | 53   | 54   | 40   | 35 | 33   |

**Tableau 64. Effet de la dose de laccase sur les paramètres de couple moyen définis au sitoxygraphe**

| Activité (nkat.g <sup>-1</sup> ms) | CM1 (N.m) | tM1 (min) | St1 (min) | Cm1 (N.m) | tm1 (min) | Af1 (N.m) | tA1 (min) | CM2 (N.m) | tM2 (min) | St2 (min) | Raf (N.m) | TRa (min) | Cm2 (N.m) | tm2 (min) | Af2 (N.m) | tA2 (min) |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0                                  | 68,8      | 3,74      | 0,82      | 62,8      | 6,66      | 6,0       | 2,9       | 64,6      | 11,3      | nd        | 1,8       | 4,7       | 57,5      | 25        | 7,1       | 13,7      |
| 1,5                                | 64,9      | 3,77      | 0,68      | 57,4      | 7,24      | 7,52      | 3,47      | 60,1      | 15,6      | nd        | 2,76      | 8,32      | 56,5      | 25        | 3,63      | 9,45      |
| 6                                  | 66,2      | 3,29      | 0,92      | 58,3      | 7,16      | 7,95      | 3,87      | 62,3      | 14,5      | nd        | 4,01      | 7,3       | 60        | 21,1      | 2,27      | 6,62      |
| 12,5                               | 65,2      | 3,38      | 0,54      | 56,5      | 6,8       | 8,7       | 3,4       | 62,5      | 18,2      | 12,5      | 6,1       | 11,4      | 59,4      | 25        | 3,1       | 6,9       |
| 25                                 | 63,1      | 3,5       | 0,6       | 55,3      | 6,0       | 7,8       | 2,5       | 63,0      | 16,0      | 9,5       | 7,6       | 10,0      | 54,0      | 25,0      | 9,0       | 9,0       |

### **4.5.5.3 Sur les mesures rhéologiques**

#### **4.5.5.3.1 Paramètres alvéographiques**

Un effet de la dose (1,5 – 6 – 12 – 25 et 35 nkat.g<sup>-1</sup> ms) de laccase PC a été déterminé à l'alvéographe<sup>®</sup> Chopin (AFNOR, 2003, tableau 63). L'ajout de dose croissante provoque une diminution de la valeur des 3 paramètres W, G et P. Pour chaque paramètre cette chute dépend de la dose ajoutée. Ainsi, le W diminue à partir d'une dose ajoutée égale à 1,5 nkat.g<sup>-1</sup> ms et le phénomène est fortement accentué après 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms ajouté. A 12 nkat.g<sup>-1</sup> ms, la force boulangère ne représente plus que 60 % de la valeur de la pâte témoin. Le G diminue légèrement avec des doses croissantes d'enzyme ajoutées jusqu'à 12 nkat.g<sup>-1</sup> ms. En ce qui concerne le P, la résistance à l'extension diminue lorsque la dose de PC ajoutée dépasse 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms et le phénomène s'accroît lorsque la dose est supérieure à 12 nkat.g<sup>-1</sup> ms. Au sein de la pâte, à la dose de 1,5 nkat.g<sup>-1</sup> ms, l'action oxydante de l'enzyme modifie les structures biochimiques sans empêcher le développement de la pâte (acquisition du maximum de résistance). A plus forte dose, la pâte semble être déstructurée pendant le pétrissage. Au delà de 6 nkat.g<sup>-1</sup> ms, l'oxydation est probablement trop importante, entraînant peut-être la dépolymérisation des arabinoxylanes et/ou la suroxydation des fonctions thiols responsables de la formation du réseau de gluten.

#### **4.5.5.3.2 Paramètres de couple moyen au sitoxygraphe**

Pour les doses (1,5-6-12,5 et 25 nkat.g<sup>-1</sup> ms), les paramètres de couple moyen définis dans la figure 77 ont été déterminés. Chaque essai est répété deux fois, les valeurs des paramètres calculés sont des moyennes et les écarts-types sont similaires pour chaque paramètre à ceux décrits dans le chapitre « mise au point du sitoxygraphe » (figure 77). Dans le tableau 64, l'augmentation de la dose de laccase ajoutée entraîne une diminution du CM1<sub>moy</sub> et Cm1<sub>moy</sub>, plus importante sur ce dernier avec pour conséquence un affaiblissement (Af1) plus important lorsque la dose d'enzyme augmente, de même le critère St1 de stabilité diminue. De plus, l'apparition de CM1<sub>moy</sub> (tM1<sub>moy</sub>) est plus précoce si la dose de laccase est importante alors que l'apparition du minimum (tm1<sub>moy</sub>) ne dépend pas de la dose d'enzyme. En revanche, quand la dose d'enzyme ajoutée augmente, le raffermissement (Raf) augmente dans la seconde phase et le second pic de consistance apparaît plus tardivement. Au-delà de 12,5 nkat.g<sup>-1</sup> ms ajoutés à la pâte, il est possible de calculer le paramètre St2 de stabilité des valeurs de couple autour du pic de consistance CM2<sub>moy</sub>. Enfin, le second minimum (Cm2<sub>moy</sub>) correspondant à la valeur de couple moyen en fin de pétrissage est de plus en plus faible.

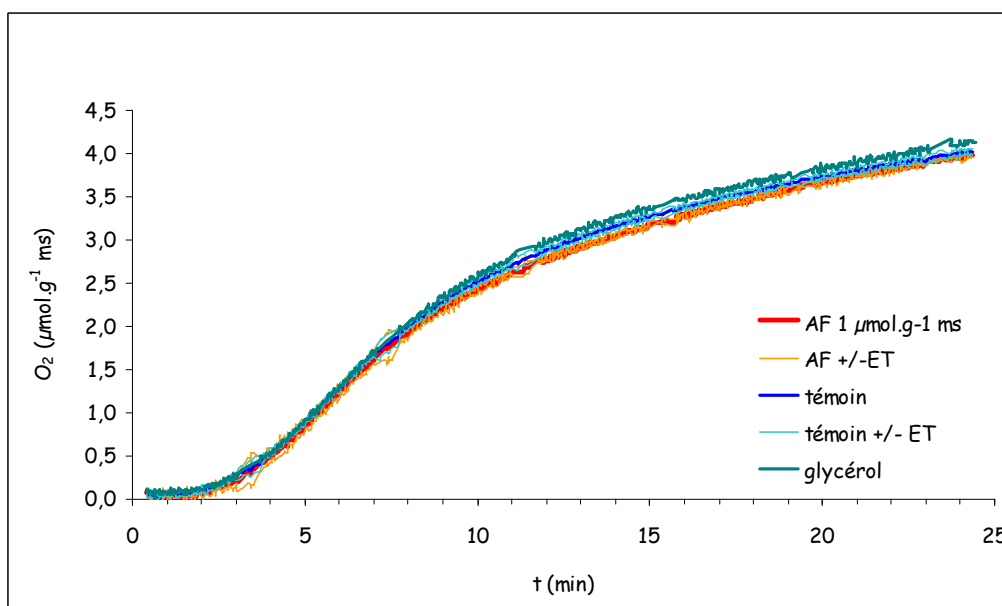


Figure 158. Effet de l'AF 1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms et du glycérol sur le consommation d'oxygène d'une farine CN04 pétrie au sitoxygraphe (2,5 kg farine, 1,5 L d'eau, 1,8 % de NaCl) pétrie pendant 25 min à 52,5 rpm (dont 2 min de frasage à 30 rpm).

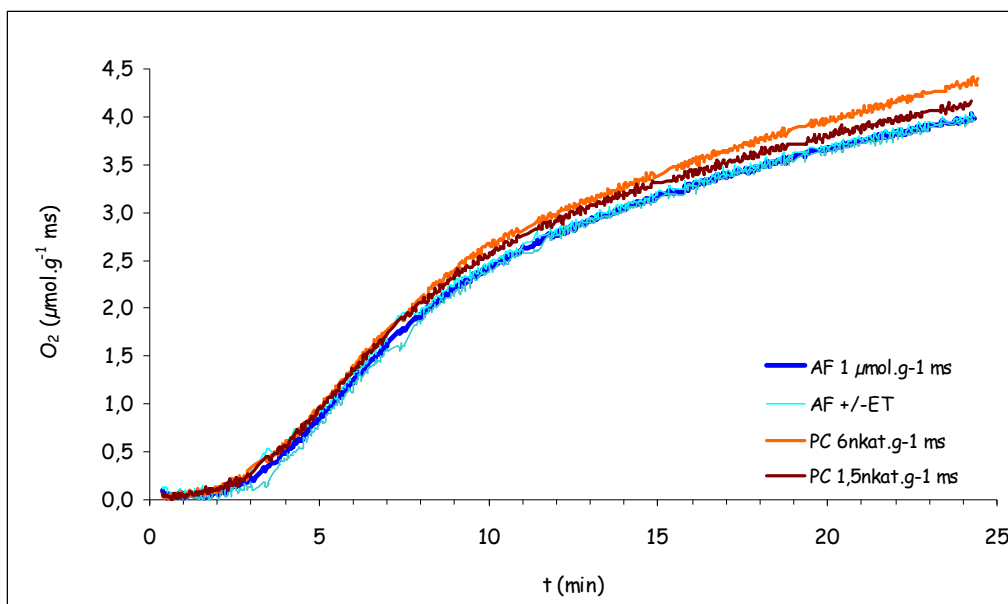


Figure 159. Effet de l'ajout de laccase PC (6 nkat.g<sup>-1</sup> ms) en présence d'AF (1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte pétrie au sitoxygraphe.

Etant donné le manque de consistance et le fort collant observé sur les pâtes contenant de fortes doses de laccase, on peut attribuer l'effet observé sur le  $CM2_{moy}$  à l'apparition du collant, et la forte diminution du  $CM2_{moy}$  à la diminution de consistance. De plus, la diminution du temps d'apparition du temps de premier pic accompagnée d'une diminution des valeurs de celui-ci vont dans le sens d'une action déstructurante rapide de l'enzyme et celle-ci d'autant plus nette que la quantité d'enzyme ajoutée est importante. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par Labat *et al.* (2000a).

### **4.5.5.4 Effet des laccases en présence de médiateur d'oxydation au cours du pétrissage**

Les essais de pétrissage en présence de laccase et de médiateur (AF et ABTS) ont été réalisés à la dose de  $6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$  de PC.

#### **4.5.5.4.1 Ajout d'AF ( $1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ )**

Pour ces essais, la pâte (composée de 2,5 kg de farine CN04, 1,5 kg d'eau distillée et 45 g de NaCl) est pétrie dans les conditions de l'étude variétale (2 min de frasage à 30 rpm suivie de 2 min de pétrissage à 52,5 rpm). L'extrait brut PC utilisé étant stabilisé avec 2 % de glycérol environ, un pétrissage témoin a été réalisé sans enzyme en ajoutant un volume théorique équivalent de glycérol. Aucun effet du glycérol n'a été constaté sur les valeurs de couple. En revanche, le glycérol provoque une légère surconsommation d'oxygène à partir de 10 min de pétrissage (figure 158). Cette surconsommation est faible mais significative étant donné la bonne répétabilité de la mesure. En présence d'AF  $1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , on observe une baisse de la consommation d' $O_2$  entre 8 et 18 min. L'AF est décrit comme un inhibiteur de la LOX, ce qui expliquerait un ralentissement de la consommation d'oxygène par cette enzyme visible vers 10 min de pétrissage. Au-delà de 15 min de pétrissage, les vitesses instantanées de consommation en présence d'AF sont supérieures au témoin puisqu'en fin de pétrissage les consommations totales de ces deux essais sont égales à  $4 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ .

Sur le couple mesuré au sitoxygraphe, l'effet de l'ajout d'AF sur les paramètres n'a pas pu être analysé car la mise au point de la mesure de couple n'était pas encore réalisée au moment de ces essais. Cependant, l'observation des pâtes montre que la présence d'AF dans la formulation rend la pâte légèrement collante, ce phénomène étant accentué en présence de laccase (Labat *et al.*, 2000a). Seules les mesures de consommations d' $O_2$  ont été réalisées.

La figure 159 montre l'effet de l'ajout de PC ( $1,5$  et  $6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur la consommation d' $O_2$  d'une pâte contenant également de l'AF ( $1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). A la dose de  $1,5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$  de



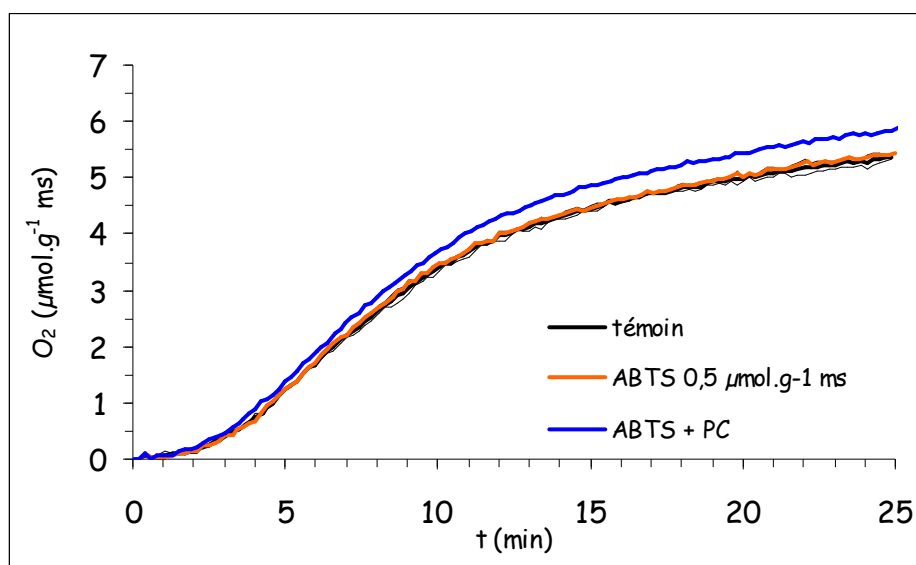


Figure 160. Effet du système médiateur d'oxydation composé de la laccase PC et d'ABTS ( $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ ) sur la consommation d' $O_2$  au cours du pétrissage

PC, le gain de consommation est de  $0,18 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  ( $\text{l}'\text{O}_{2\text{total}}$  consommé après 25 min passe de 3,97 à  $4,15 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ ). La surconsommation a lieu entre 5 et 10 min, puisque après 10 min de pétrissage, l'écart est constant avec la courbe témoin (pâte contenant uniquement de l'AF). Quand la quantité d'enzyme ajoutée est plus importante, la surconsommation finale est de  $0,38 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ . Si on admet une stoechiométrie de 4 moles d'AF oxydées pour une mole d' $\text{O}_2$  consommée, la surconsommation d' $\text{O}_2$  devrait être de  $0,25 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  pour  $1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'AF ajouté. Si l'on tient compte des  $0,4 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'AF estérifié présentes dans la farine (Louarme *et al.*, 2004), la surconsommation théorique est de  $0,35 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ , voisine de celle observée entre le témoin et le témoin + AF +  $6 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$  de laccase PC.

### 4.5.5.4.2 Ajout d'ABTS ( $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ )

Un essai a été réalisé en ajoutant  $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'ABTS seul ou en présence de  $6 \text{ nkat.g}^{-1}$  d'enzyme PC lors du pétrissage d'une pâte fabriquée à partir de farine CNS (conditions d'hydratation et vitesses identiques à celles précisées dans le chapitre précédent). Les pâtes ont été pétries en absence ou en présence de 1 % de levure.

#### 4.5.5.4.2.1 Pâtes sans levure.

Pour ces conditions expérimentales, les courbes de consommations d' $\text{O}_2$  sont fournies dans la figure 160. L'ajout d'ABTS seul ne provoque pas de variation de la consommation par rapport à une pâte témoin. En revanche, lors la mise en présence de PC dans la pâte, une surconsommation d' $\text{O}_2$  totale de  $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  apparaît après 25 min de pétrissage. Comme dans le cas de l'AF, une stoechiométrie de 1 mole d' $\text{O}_2$  consommée pour 4 moles d'ABTS oxydées montre que la surconsommation d' $\text{O}_2$  est largement supérieure à celle nécessaire pour oxyder l'ABTS, une surconsommation de  $0,125 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d' $\text{O}_2$  devrait être observée suite à l'addition de  $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  d'ABTS. Par comparaison avec l'AF ajouté précédemment, la quantité d'ABTS est 2 fois moins importante alors que la surconsommation est supérieure (+  $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$  au lieu de  $0,38 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). Le système médiateur laccase/ABTS semble plus efficace que le système avec laccase/AF. Cette surconsommation est visible dès les premiers instants de pétrissage. Lors du mélange des ingrédients pendant le frasage, l'ABTS est rapidement oxydé par la laccase entraînant l'apparition d'une couleur bleu-verte caractéristique du radical  $\text{ABTS}^\circ$  formé. Puis, quand la pâte est formée, la couleur disparaît immédiatement. Par analogie avec les observations faites en milieu modèle, le radical en réagissant avec des molécules oxydables présentes dans la pâte est probablement réduit en molécule d'ABTS initiale, puis ré-oxydé par la laccase au cours du pétrissage

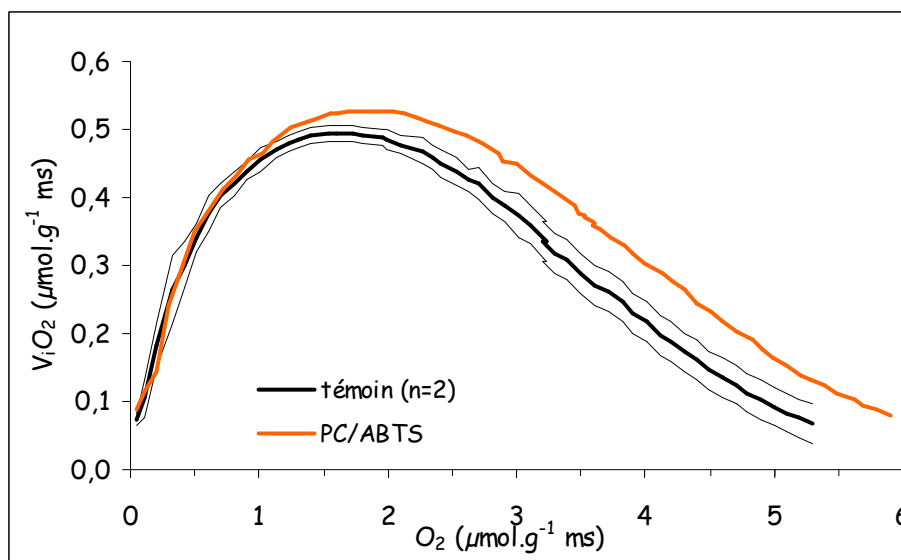


Figure 161. Effet du système ABTS/PC sur les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> exprimées en fonction de l'O<sub>2</sub> consommé dans la pâte

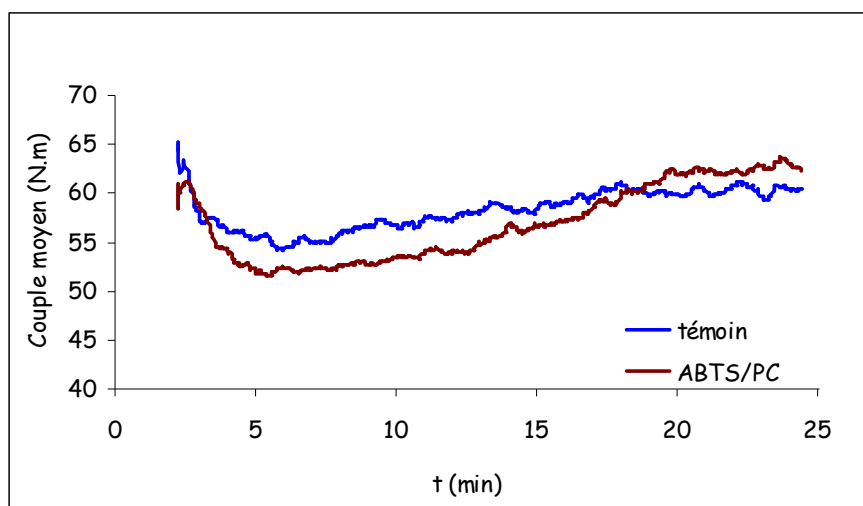


Figure 162. Comparaison des allures de courbes de couple moyen en présence ou en absence du système médiateur ABTS/PC

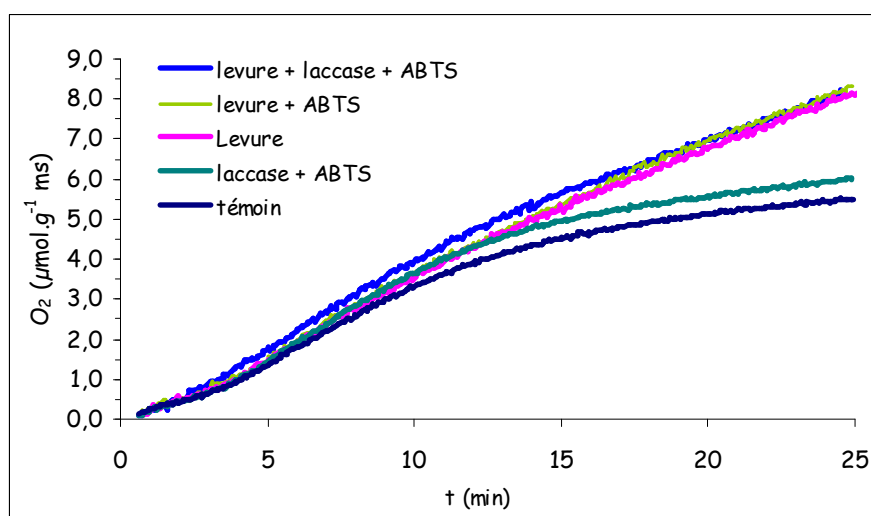


Figure 163. Effet du système ABTS/PC médiateur d'oxydation sur la consommation d'oxygène de pâtes pétries en présence ou en absence de levure (1 %).

transmettant ainsi sa forme radicalaire à d'autres molécules de la pâte. De plus, dès 5 min de pétrissage, la pente de la courbe est supérieure à celle du témoin, indiquant que les vitesses d'oxydation en présence du système médiateur sont plus importantes.

Les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> de la courbe témoin et de la pâte contenant le système médiateur ont été représentées en fonction de l'O<sub>2</sub> consommé au cours du pétrissage (figure 161). Jusqu'à 1 μmol.g<sup>-1</sup>ms d'O<sub>2</sub> consommé dans la pâte les vitesses sont identiques. Lorsque la consommation d'O<sub>2</sub> augmente, l'écart entre les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte contenant le système médiateur et de la pâte témoin augmente et lorsque 2 μmol.g<sup>-1</sup> ms d'O<sub>2</sub> sont consommés, il devient constant (environ 0,1 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>, soit 1,7 nkat.g<sup>-1</sup> ms). La vitesse maximale de consommation d'O<sub>2</sub> est alors de 0,52 μmol.g<sup>-1</sup> ms.min<sup>-1</sup>. Après le pétrissage, en présence d'ABTS et de laccase, la pâte au repos se teinte progressivement d'une couleur violette qui s'intensifie au fur et à mesure que la période de repos s'allonge, Cette couleur rappelle celle observée quand la tyrosine est mise en présence d'ABTS en milieu modèle.

L'effet engendré par le système médiateur ABTS/PC a été étudié sur les courbes de couple moyen (figure 162). On observe une diminution du CM1<sub>moy</sub> et du Cm1<sub>moy</sub>, conduisant à un affaiblissement important et rapide en début de pétrissage de la pâte. Dans la seconde phase du pétrissage, les valeurs de couple moyen ré-augmentent, et deviennent supérieures à celles du témoin vers 19 min de pétrissage. Le Raffermissment observé est alors supérieur à l'affaiblissement initial (supérieur à 10 N.m). En revanche, le second pic de consistance ne peut être déterminé car les valeurs de couple ne passent pas par un maximum. Bien qu'apparemment moins collante et moins inconsistante que la pâte supplémentée en AF et en PC, le fait d'observer un raffermissment important en fin de pétrissage ne peut s'expliquer uniquement par un effet structurant de la pâte.

#### 4.5.5.4.2.2 Pâtes additionnées de 1 % de levure

En présence de levure, la consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte est fortement augmentée (figure 163). En effet, 8 μmol.g<sup>-1</sup> ms sont consommées après 25 min en présence de levure, soit 3 μmol.g<sup>-1</sup> ms de plus que la pâte témoin dépourvue de levure. Cette surconsommation est décelable à partir de 7 min de pétrissage et l'allure générale des consommation d'O<sub>2</sub> des pâtes levurées est quasi-linéaire (vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> quasi-constante au cours du temps). En présence d'ABTS seul (et de levure), aucune différence n'est observée sur les consommations d'O<sub>2</sub> par rapport à la pâte contenant uniquement la même dose de levure. Comme dans le cas des pâtes non supplémentées en levure, l'ajout du système ABTS/PC

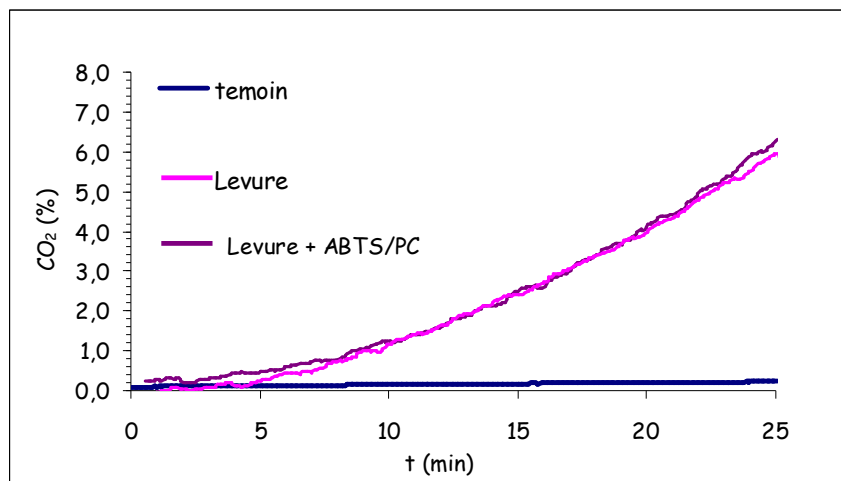


Figure 164. Pourcentage de CO<sub>2</sub> produit lors du pétrissage de pâte en présence de levure avec ou sans système médiateur d'oxydation et en absence de celle-ci.

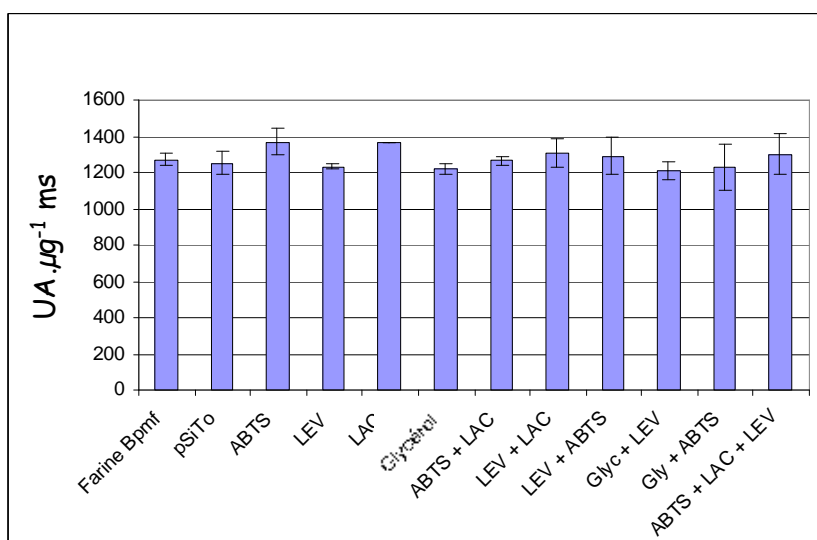


Figure 165. Fractions totales des protéines extraites des pâtes pétries en présence de levure (ou non), en présence de système médiateur ((ou non et en présence de glycérol ou non) d'oxydation et en absence de celle-ci.

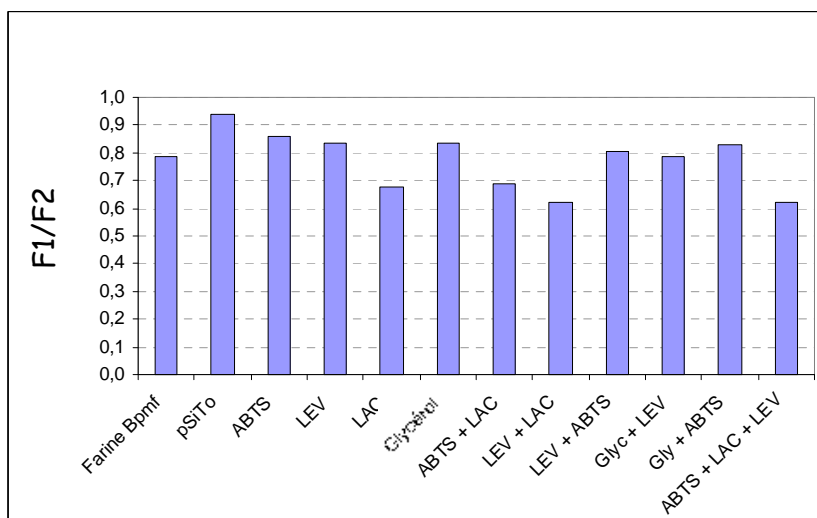


Figure 166. Rapport de fractions F1/F2 des protéines extraites des pâtes pétries en présence de levure (ou non), en présence de système médiateur ((ou non et en présence de glycérol ou non) d'oxydation et en absence de celle-ci.

augmente les consommations ainsi que les vitesses instantanées de consommation instantanées d'O<sub>2</sub> des pâtes levurées et non levurées dans les premiers instants du pétrissage. En présence de levure, la hausse de consommation d'O<sub>2</sub> provoquée par l'ajout du système ABTS/PC est visible plus rapidement. En revanche, vers la fin du pétrissage, la pâte contenant de la levure et le système ABTS/PC atteint le même niveau de consommation d'O<sub>2</sub> que la pâte additionnée de levure (8  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ). Entre 10 et 15 min, les vitesses instantanées de consommation de cette pâte subissent un ralentissement qui se poursuit jusqu'à la fin du pétrissage. La présence dans le milieu d'un composé très réactif (ABTS<sup>o</sup>) semble donc interférer sur l'activité de la levure. Les productions de CO<sub>2</sub> engendrée par la présence de levure ont été examinées.

Pour une pâte sans levure, le pourcentage de CO<sub>2</sub> augmente très faiblement et proportionnellement au temps (0,3 % à t = 25 min de pétrissage). En présence de 1 % de levure (figure 164), la vitesse de production de CO<sub>2</sub> s'accroît au cours du pétrissage. En fin de pétrissage (à 25 min), la teneur de CO<sub>2</sub> dans la cuve est d'environ 8 %. La même cinétique de production de CO<sub>2</sub> est observée pour la pâte contenant la levure avec le système médiateur d'oxydation. La présence d'ABTS oxydé dans la pâte semble donc uniquement modifier la cinétique de réaction d'oxydation mais pas la production de CO<sub>2</sub> par fermentation de la levure qui débute pendant le pétrissage.

L'effet observé sur les paramètres de couple est identique en présence ou en absence de levure pour des pâtes contenant le système ABTS/PC : c'est-à-dire un affaiblissement accru par la présence du médiateur, puis un raffermissement dans la seconde phase du pétrissage associé à l'apparition d'un fort collant de la pâte en fin de pétrissage (données non montrées).

#### 4.5.5.4.2.3 Effet sur l'état d'agrégation des protéines

Les pâtes pétries en présence de levure ou non et en présence du système médiateur ou non ont été congelées dans l'azote liquide immédiatement après le pétrissage. Un pétrissage témoin sans levure en présence de glycérol a également été analysé. Pour chaque pâte, les protéines sont extraites (dénaturation et solubilisation) et le profil protéique de chaque échantillon est obtenu par CLHP (détection UV à 214 nm). Pour l'ensemble des essais étudiés, la fraction totale rest constante quelle que soit la formulation (figure 165). la quantité totale de chaque pâte donne une absorbance moyenne de 1276 UA. $\mu\text{g}^{-1} \text{ ms}$  (CV < 10 %). La figure 166 présente le rapport des gluténines de haut poids moléculaires (HMW-GS) sur les gluténines de bas poids moléculaires (LMW-GS). Les résultats obtenus montre que par rapport à la farine (F1/F2 = 0,8), le pétrissage augmente le rapport F1/F2 des protéines de la

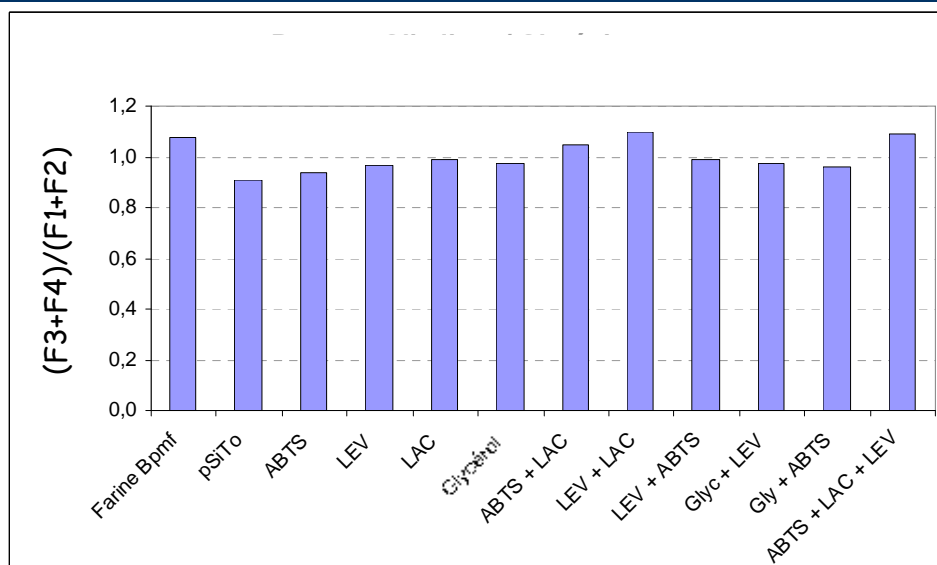


Figure 167. Rapport gliadines / gluténines ((F3+F4)/(F1+F2)) des protéines extraites des pâtes pétries en présence de levure (ou non), en présence de système médiateur ((ou non et en présence de glycérol ou non) d'oxydation et en absence de celle-ci.

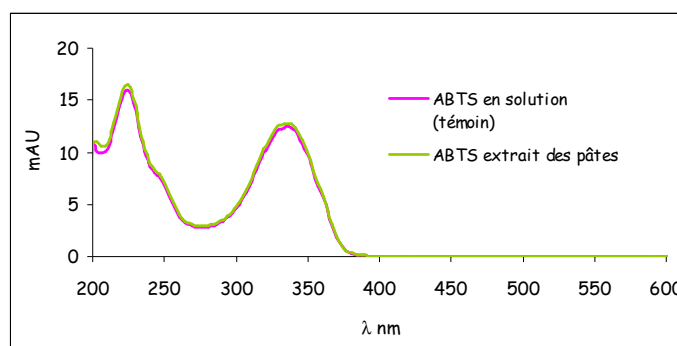


Figure 168. Détection du pic correspondant à l'éluion d'ABTS dans les échantillons de pâte analysé par CLHP –UV.

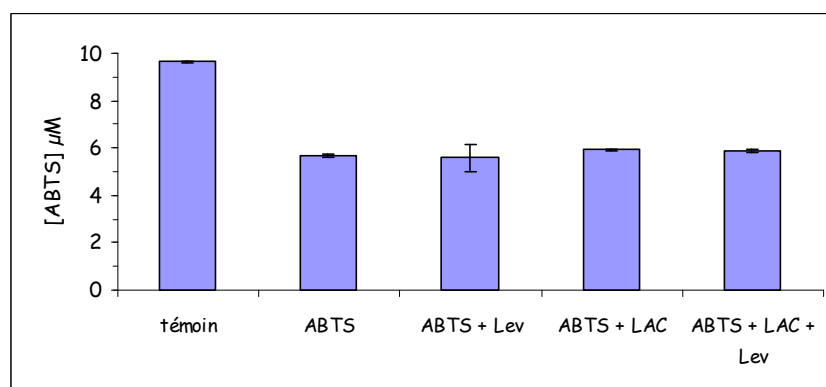


Figure 169. Quantification par HPLC – DAD de l'ABTS libre dans les extraits protéiques des pâtes. Témoin : réponse correspondant à une solution d'ABTS 10 μM injecté directement dans le système HPLC

pâte non levurée ( $F1/F2 = 0,92$ ). L'ajout de levure, d'ABTS et de glycérol seul ou deux à deux ramène la valeur du rapport à celui observé dans la farine ( $F1/F2 \sim 0,8$  à  $0,82$ ). L'ajout de laccase PC provoque une diminution du rapport plus importante ( $F1/F2 = 0,69$ ), accentuée en présence de levure ( $F1/F2 = 0,61$ ). La présence du médiateur n'augmente pas l'effet sur le rapport (en présence ou en absence de levure). Pour chaque essai, le rapport gliadine sur gluténines ( $(F3+F4)/(F1+F2)$ ) a également été représenté (figure 167). Les résultats montrent que le pétrissage affecte la valeur de ce rapport (1,1 pour la farine, 0,9 pour la pâte témoin). L'ajout d'ABTS, levure, glycérol provoque une augmentation (valeurs entre 0,95 et 1), de même que l'ajout de laccase (valeur du rapport égale à 1). L'ajout de laccase et de levure provoque une plus forte augmentation du rapport (valeur de 1,1 en présence d'ABTS ou non).

Ainsi, l'addition de laccase à la pâte semble provoquer une diminution du nombre de polymères de hauts poids moléculaires au profit des protéines de bas poids moléculaires et des gliadines. Ce phénomène est accentué en présence de médiateur mais aussi en présence de levure. En présence d'ABTS, les réactions d'oxydation font augmenter le rapport gliadines sur gluténines. La présence de glycérol dans l'échantillon modifie le profil protéique de la pâte, mais les modifications sont faibles comparées à l'effet dû à l'enzyme.

Du fait de sa toxicité, l'utilisation d'ABTS dans le domaine agroalimentaire n'a aucun avenir. Cependant, son intérêt réside dans l'étude théorique de système médiateur capable de modifier les réactions d'oxydation. Lors de l'élution des échantillons de pâte, il a été possible de d'identifier le pic correspondant à l'ABTS (temps de rétention 23 min) ajouté dans la formulation de la pâte à l'aide de son spectre UV-visible (figure 168). La quantification de l'ABTS résiduel dans les extraits protéiques a été réalisée par l'injection d'un témoin ([ABTS]  $10 \mu\text{M}$  directement dissous dans le tampon). Si la totalité d'ABTS ajoutée à la farine ( $1 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) est extrait en même temps que les protéines de la pâte et si celui-ci est libre, la concentration d'ABTS serait égale à  $8 \mu\text{M}$ . Ainsi, seul 75 % du médiateur ajouté est retrouvé à l'état libre en fin de pétrissage (figure 169). Les 25 % disparus ont été probablement impliqués dans des réactions de couplage avec les résidus tyrosine (apparition de la couleur violette dans les pâtes). Les résultats présentés montrent que l'ABTS peut modifier le niveau d'oxydation au sein de la pâte et permettre l'oxydation de composés non oxydables par les systèmes endogènes classiques (interaction probable avec la tyrosine). Cependant, les conditions actuelles d'utilisation d'ABTS (et d'AF) avec la laccase pour oxyder les composés biochimiques de la farine semblent plaider en faveur d'une trop forte oxydation au sein de la pâte, ayant un effet global plutôt négatif sur les qualités boulangères





## ***Résultats et Discussions***

---

des pâtes. Le fait que les effets de dépolymérisation soient amplifiés en présence de levure est également un point négatif pour ces systèmes dans le domaine de la panification.

L'effet affaiblissant de la laccase PC a pu être mesuré avec le sitoxygraphe (effet sur les paramètres de couple) en accord avec les résultats obtenus par Labat *et al.* (2000a). En présence d'AF, la surconsommation d'O<sub>2</sub> provoquée par l'ajout de laccase est renforcée. Cependant, Selinheimo *et al.* (2006) ont récemment montré à l'aide du test de Kieffer que l'ajout de laccase améliore la résistance à l'extension des pâtes.



## 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Initié en Octobre 2003, ce programme de thèse avait pour objectif premier de mettre au point un pétrin instrumenté pour caractériser le comportement des farines pendant le pétrissage. Ce pétrin, le sitoxygraphe, est une évolution du bioréacteur, un pétrin conçu et instrumenté au laboratoire pour l'analyse simultanée des échanges gazeux (consommation d'O<sub>2</sub> et production de CO<sub>2</sub>) et la consistance des pâtes pendant le pétrissage. Le sitoxygraphe est un pétrin instrumenté étanche qui fournit :

- un ensemble de données pour caractériser les farines ainsi que l'effet d'améliorants, d'un point de vue oxydatif (consommation d'O<sub>2</sub>) et rhéologique (couple moteur) ;
- des échantillons de pâte pour mener des analyses biochimiques et rhéologiques.

Le second objectif concerne l'étude des laccases, des oxydoréductases potentiellement intéressantes en panification, et la caractérisation de leurs effets pendant le pétrissage.

Lors de cette thèse, la mise en évidence de corrélations entre des évolutions biochimiques (consommation d'O<sub>2</sub>, activité enzymatique, teneur en substrat redox) des pâtes et leurs propriétés rhéologiques (paramètres de couple) pendant le pétrissage au sitoxygraphe, ainsi qu'avec les propriétés technologiques (rhéologie empirique des pâtes, qualité des pains qui en résultent après cuisson) a pour objectif d'évaluer la contribution des phénomènes oxydatifs dans l'acquisition des propriétés rhéologiques uniques de la pâte qui influencent les caractéristiques du produit final.

Lors de la mise au point, après un certain nombre de vérifications nécessaire à la mesure des pourcentages gazeux dans le pétrin (étanchéité, détermination du volume), l'instrumentation a été développée.

Tout d'abord, inspirée du système d'analyse des gaz du bioréacteur, la mesure des teneurs en dioxygène et en dioxyde de carbone a été adaptée au sitoxygraphe. Le changement d'échelle d'un volume de 1,5 L au bioréacteur à un volume de 10 L au sitoxygraphe a mis en évidence la nécessité de prendre en compte deux phénomènes, négligés au bioréacteur : l'inertie importante sur les mesures de gaz due à l'homogénéisation de l'enceinte gazeuse et l'influence de la pression sur la réponse du capteur à oxygène. Une correction constante d'une minute, résultant d'un décalage entre la valeur lue sur le capteur et le pourcentage gazeux réel au niveau de la pâte, est appliquée sur l'échelle des temps. Pour prendre en compte l'influence de la pression sur la réponse du capteur à oxygène, un capteur de pression a été mis en place. La relation entre la variation du pourcentage d'O<sub>2</sub> affiché et la pression a été établie pour une teneur de 20,9 % d'O<sub>2</sub>, puis extrapolée lorsque ce pourcentage diminue au cours du pétrissage.



## *Conclusions et Perspectives*

---

Par ailleurs, la mesure de la pression pendant le pétrissage a révélé que lors de la formation de la pâte, une surpression de quelques dizaines de mbar consécutive à la diminution rapide du volume gazeux apparaissait. Ainsi, le volume de la farine (correspondant à 2,5 kg de poudre) et d'eau (1,5 L de liquide) est inférieur à celui de la pâte, d'environ 100 à 200 mL. La formation de la pâte étant un phénomène complexe (passage d'un milieu discontinu à un milieu homogène, libération du gaz occlus dans la farine), la mesure de l'augmentation du volume de pâte est difficilement réalisable (volumes déterminés peu précis), en revanche, la mesure de pression apparaît fiable (précise et répétable). L'augmentation du volume de la phase condensée fait diminuer le volume de gaz dans l'enceinte environnant la pâte entraînant une surpression. Une fois formée, lors du pétrissage de la pâte, une diminution de la pression est observée, attribuable à la fixation de l'O<sub>2</sub> au sein de la pâte (importante par rapport à la production de CO<sub>2</sub> dans le cas des pâtes non levurées). De plus, l'incorporation d'air dans la pâte pourrait également influencer la variation de pression dans l'enceinte gazeuse (modification de la densité de celle-ci).

La mesure de couple est obtenue par la mesure de l'intensité électrique nécessaire au moteur pour maintenir la vitesse de consigne constante. Une courbe d'étalonnage intégrée par le constructeur au niveau du variateur permet d'obtenir une mesure directement transformée en N.m. La vitesse du bras est également mesurée.

Pour l'ensemble des paramètres mesurés (pourcentages gazeux, pression, couple, vitesse), un programme d'acquisition a été développé sous Labview<sup>®</sup>. Celui-ci permet deux types d'acquisition, l'une réalisée à basse fréquence (de l'ordre de 0,5 Hz) pour les données gaz et pression et l'autre réalisée à haute fréquence (50 Hz) pour les données couple et vitesse du bras. Cette dernière permet de mesurer les variations des valeurs de couple pendant un tour de bras (57 valeurs de couple par tour de bras à 52,5 rpm). Tout au long du pétrissage, le système d'acquisition alterne entre les deux types d'acquisition.

L'exploitation des données brutes a été systématisée et pour cela, des macros Excel ont été développées. Pour les mesures gazeuses, la macro permet de transformer les pourcentages gazeux en  $\mu\text{mol}$  de gaz (O<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>) produites ou consommées par gramme de matière sèche. Dans le cas de l'oxygène, la correction de la pression est appliquée et cette dernière est lissée par une moyenne glissante. La mise en équation des courbes de consommation d'oxygène a été réalisée par deux modèles successifs (modèle de Rodbard) permettant de modéliser des courbes de type sigmoïde. La dérivée du modèle a permis d'extraire les vitesses instantanées de consommation d'oxygène des courbes de consommation d'oxygène, pour aboutir à





## *Conclusions et Perspectives*

---

l'expression de celle-ci soit en fonction du temps, soit en fonction de la quantité d'O<sub>2</sub> consommée.

Le traitement des données de couple (haute fréquence) est réalisé par une macro permettant d'extraire les valeurs maximales et minimales obtenues lors de chaque tour de bras. Après lissage des valeurs (moyenne glissante), les maxima et minima obtenus sont utilisés pour définir une courbe de couple moyen (moyenne des maxima et des minima) et une courbe d'épaisseur (différence entre les maxima et minima). A partir de ces courbes, 32 paramètres sont définis, puis utilisés pour caractériser le comportement rhéologique des pâtes pétries au sitoxygraphe.

Pour valider la mise au point, l'influence des conditions de pétrissage est étudiée pour quelques paramètres. Dans un premier temps, la mise en place d'un plan d'expériences pour étudier les influences respectives de la vitesse (entre 30 et 75 rpm), de la température de départ des ingrédients (entre 10 et 20 °C) et de l'hydratation (entre 57 et 63 %) sur la cinétique de consommation d'O<sub>2</sub> montre que les trois facteurs ont des effets linéaires et indépendant les uns des autres sur les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub>. La vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> est principalement favorisée par :

- l'augmentation de la vitesse de rotation du bras qui améliore l'incorporation d'oxygène et favorise les contacts enzyme-substrats ;
- la diminution de l'hydratation qui provoque une augmentation de la concentration en substrats redox dans la pâte, permettant aux enzymes d'agir plus rapidement ;
- une augmentation de la température des ingrédients qui favorise l'activité enzymatique.

Ces résultats confirment en partie des observations obtenues avec le bioréacteur sur des pâtes plus hydratées (autour de 70 % par rapport à la farine humide dans le cas du bioréacteur), la géométrie de ce dernier et les vitesses de pétrissage (au delà de 100 rpm) utilisées étant également différentes. Ainsi, les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> sont limitées par l'apport d'O<sub>2</sub> aux systèmes enzymatiques, les contacts enzyme-substrat et la concentration de ces derniers.

Dans un second temps, l'effet de la masse de pâte et de la réduction du volume de phase gazeuse par l'ajout d'une pièce plastique a été étudié. Seule la vitesse maximale de consommation d'O<sub>2</sub> est influencée par la masse de pâte. Pour une quantité d'eau distillée ajoutée identique (60 % d'eau par rapport à la farine humide), la  $V_{iO_2MAX}$  passe de 0,4 à 0,5



## *Conclusions et Perspectives*

$\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms.min}^{-1}$  lorsque la masse de pâte devient supérieure à 4 kg. Cet effet de seuil indique que l'efficacité de pétrissage intervient dans la consommation d' $\text{O}_2$ , d'une part, l'incorporation d' $\text{O}_2$  est probablement dépendante du remplissage de la cuve, et d'autre part, la surface d'échange avec l'atmosphère gazeuse, modifiée par l'extension et la compression de la pâte, joue probablement un rôle. La réduction de volume gazeux par l'ajout de la pièce plastique ne modifie pas les cinétiques de consommation d' $\text{O}_2$  et ce dernier n'est pas limitant puisque moins de 10 % de la quantité d' $\text{O}_2$  initiale est consommée. Concernant les données de couple, l'augmentation de la masse de pâte entraîne une augmentation proportionnelle des valeurs de couple maximale ( $C_{\text{MAX}}$ ) et minimale ( $C_{\text{min}}$ ), mais seuls le temps d'apparition du second maximum ( $t_{\text{M2}}$ ) et la stabilité (St2, durée pour laquelle les valeurs de couple sont supérieures à 95 % de la valeur du second maximum de couple) sont modifiés. Leurs valeurs augmentent avec la masse de pâte introduite dans la cuve.

Après avoir mis en évidence l'influence des conditions de pétrissage sur les mesures, l'influence de la formulation des farines sur les mesures réalisées avec les pétrins instrumentés (bioréacteur et sitoxygraphe) a été étudiée. Des liens entre les données mesurées (oxygène, couple) ont été établis avec des données biochimiques obtenues par analyse des farines et des pâtes, les données rhéologiques et les qualités boulangères des farines dans le cadre de deux études variétales sur trois années de récolte (2002, 2003 et 2005). De plus, les effets d'améliorants couramment utilisés ont été mesurés (acide ascorbique, cystéine, bromate, glucose oxydase).

Lors de la première étude variétale réalisée seulement avec le bioréacteur, il a été montré que les courbes de consommation d' $\text{O}_2$  et les 4 paramètres de couple définis à partir des courbes de couple pouvaient fournir des informations complémentaires aux données rhéologiques des farines, permettant en outre la discrimination de 12 variétés de farines selon ces paramètres. Cependant, la surhydratation nécessaire des pâtes au bioréacteur impose la prudence dans l'interprétation des phénomènes rhéologiques, rendant difficile les liens avec les données rhéologiques classiques. Les paramètres de couple issus du bioréacteur n'ont pas été pris en compte dans l'étude variétale 2005 (13 farines). Mais les données d'oxygène sont venues compléter l'ensemble des données acquises au sitoxygraphe, de même, les données biochimiques sur les pâtes issues du bioréacteur ont été analysées. Au total, les données analysées rassemblent des données oxygène et des données biochimiques (farine et pâte) pour les deux pétrins, des données rhéologiques (couple du sitoxygraphe, consistographe<sup>®</sup>, farinographe<sup>®</sup>, alvéographe<sup>®</sup>) et des données issues des tests de panification. Les résultats obtenus ont confirmé l'importance du système lipoxygénasique, les vitesses instantanées de



## *Conclusions et Perspectives*

---

consommation d'oxygène initiales étant fortement corrélées avec la teneur en AGL oxydables des farines. Bien qu'aucune corrélation n'ait pas pu être mise en évidence entre les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> et l'activité LOX des farines, la dénaturation quasi totale de celle-ci a été constatée dans les pâtes issues des deux pétrins, dénaturation expliquée par le fonctionnement de cette enzyme. L'absence de corrélation avec les vitesses instantanées de consommation d'oxygène peut être attribuée à la faible variabilité dans les activités LOX des farines étudiées. Jusqu'à 70 % de la quantité totale d'oxygène consommée peut être attribuée à l'oxydation des acides gras polyinsaturés des fractions AGL et MAG (PUFA oxydables), et la vitesse de consommation d'oxygène devient inférieure à 80 % de la vitesse maximale pour des quantités d'oxygène consommées proches du nombre de moles de PUFA oxydables dosés dans les farines. Ces derniers représentent moins de 10 % de la quantité totale de PUFA contenus dans l'ensemble des fractions lipidiques. Ainsi, la vitesse de consommation d'oxygène dépend aussi de systèmes redox secondaires. La contribution de l'activité CAT et POD a été mise en évidence par la corrélation de ces activités avec les vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub>, principalement dans la phase finale du pétrissage (effet plus visible au bioréacteur). Les noyaux hématiniques de ces enzymes pourraient oxyder les PUFA des farines (parmi les 90 % non substrats de la LOX) par un mécanisme non enzymatique, et par conséquent moins spécifique comparé au système lipoxygénasique. En fin de pétrissage, les PUFA substrats de la LOX sont consommés et l'activité de cette dernière est faible, alors qu'à l'opposé, les composés hématiniques sont intacts et disposent probablement de substrats, ceci expliquerait que la participation des composés hématiniques soit détectée principalement en fin de pétrissage. Leur participation aux phénomènes de consommation d'O<sub>2</sub> n'est pas exclue en début de pétrissage, mais, la compétition vis-à-vis de l'O<sub>2</sub> est très probablement à l'avantage de la LOX.

La comparaison du sitoxygraphe et du bioréacteur a montré que :

- les quantités d'O<sub>2</sub> consommées sont corrélées ( $r = 0,8$ ), la consommation totale moyenne obtenue au sitoxygraphe représentant environ 95 % de celle obtenue au bioréacteur ;
- les vitesses instantanées de consommation d'oxygène sont également corrélées d'un appareil à l'autre. Cependant, les instants des vitesses instantanées de consommation d'oxygène les mieux corrélées pour chaque appareil sont reliés par une fonction affine différente en début et milieu de pétrissage. Le pétrissage plus efficace (incorporation d'oxygène, extension, compression de la pâte) à une hydratation plus faible est responsable des cinétiques rapides au sitoxygraphe. A la vitesse maximale de consommation d'oxygène, la



## *Conclusions et Perspectives*

---

vitesse de consommation au sitoxygraphe est en moyenne 2,2 fois plus grande qu'au bioréacteur ;

- la discrimination des farines par analyse en composantes principales selon leurs paramètres d'oxygène est identique quel que soit le pétrin, en revanche, elle semble plus précise au sitoxygraphe, en raison d'une meilleure répétabilité ;

- en fin de pétrissage, la diminution en activité LOX dans les pâtes des deux pétrins représente 85 % de l'activité de la farine, la quasi-totalité des PUFA des fractions AGL et MAG a été oxydée, de même, la quasi-totalité des caroténoïdes sont co-oxydés. L'activité POD est stable tandis que l'activité CAT est plus faible dans les pâtes du bioréacteur. Cette dernière est dénaturée lorsqu'elle se trouve à pH acide, au bioréacteur, l'exposition est plus longue (60 min de pétrissage) ;

- peu de différences sont obtenues entre l'état d'agrégation des protéines dans les pâtes issues des deux pétrins. Le pétrissage plus drastique au sitoxygraphe semble toutefois engendrer une dépolymérisation des protéines plus importante pour certaines farines (diminution du rapport F1/F2).

L'analyse des paramètres de couple déterminés à partir des courbes de couple moyen et d'épaisseur de couple a permis de sélectionner 4 paramètres sur les 32 définis initialement à partir des allures générales des courbes : le premier maximum de consistance (CM1), le temps d'apparition du minimum de couple (tm1), l'affaiblissement (Af1, différence entre le premier maximum et le minimum de couple) et le raffermissment (Raf, différence entre le minimum de couple et le second maximum de couple). Un lien a été établi entre les phénomènes d'oxydation au sein de la pâte et les paramètres de couple du sitoxygraphe :

- corrélation entre les vitesses finales de consommation d'oxygène et tm1, ainsi qu'Af1 ;

- corrélation entre les vitesses initiales de consommation d'O<sub>2</sub> et Raf.

Les paramètres de couple pertinents du sitoxygraphe ont aussi été corrélés avec des données de rhéologies empiriques. CM1 est corrélé avec le paramètre de consistance maximale du consistographe<sup>®</sup>, tm1 semble plutôt corrélé avec la ténacité (P) mesurée à l'alvéographe<sup>®</sup>, Af1 et Raf sont corrélés négativement avec les paramètres de stabilité et d'affaiblissement à 12 min au farinographe<sup>®</sup> et stabilité au consistographe<sup>®</sup>. Enfin, Raf est corrélé avec le paramètre d'extensibilité (G). Ces résultats confirment la contribution des systèmes enzymatiques dans l'acquisition des propriétés rhéologiques des pâtes. De plus, la mesure simultanée de la consommation d'oxygène avec la mesure du couple au sitoxygraphe





## Conclusions et Perspectives

---

permet de relier les phénomènes oxydatifs avec les propriétés rhéologiques et technologiques des farines. Le caractère prédictif des paramètres obtenus directement pendant le pétrissage semble une voie intéressante à explorer.

Un second volet de l'effet de la formulation des pâtes a été abordé lors de l'ajout d'améliorant couramment utilisé en panification (acide ascorbique, cystéine, bromate, azodicarbonamide, glucose oxydase). Des effets très différents ont été observés tant sur les cinétiques de consommation d'O<sub>2</sub> que sur les paramètres de couple. A l'exception de l'azodicarbonamide, les améliorants à caractère oxydant (acide ascorbique, bromate, GOX) améliorent l'intensité des réactions d'oxydation par une augmentation de la consommation totale d'oxygène, de la vitesse maximale de consommation d'oxygène ou un maintien de cette vitesse sur une durée plus importante. Dans le cas de l'acide ascorbique et de la glucose oxydase, les réactions enzymatiques font intervenir l'oxygène, en revanche, les réactions faisant intervenir le bromate ne sont pas consommatrices d'oxygène, en théorie. Concernant les paramètres de couple, la plupart des agents oxydants entraînent une diminution du premier maximum de couple (CM1), à l'exception du bromate lorsqu'il est ajouté en fort excès (0,26 μmol.g<sup>-1</sup> ms). De plus, en règle générale, l'apparition du minimum de couple (tm1) est plus tardive, et l'affaiblissement dans la première phase est plus important. L'effet raffermissant est généralement plus tardif que le témoin et est plus ou moins marqué selon l'améliorant et la dose utilisée. Au contraire, la glucose oxydase semble avoir un effet de raffermissement rapide, puis en présence de glucose, les valeurs de couple chutent de façon importante après 15 min de pétrissage, les pâtes ayant un aspect granuleux et déstructuré. Par ailleurs, la cystéine en tant que réducteur diminue la vitesse maximale de consommation mais ralentit également la diminution de vitesse de consommation observée en fin de pétrissage. Aucune différence n'a été déterminée sur les valeurs des paramètres de couple par rapport au témoin. Ainsi, l'analyse simultanée des cinétiques d'oxydation et des paramètres de couple fait apparaître des différences dans les effets observés. Par manque de temps, des analyses biochimiques n'ont pu être réalisées pour expliquer les mécanismes mis en jeu.

La dernière partie de cette thèse a pour but de caractériser l'effet des laccases au sein des pâtes. Sur 5 extraits de laccases, 2 ont été retenus après détermination de leurs efficacités relatives à pH 4 et 5,6. La laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (PC) et la laccase recombinante K1 possèdent les meilleures efficacités relatives à pH 5,6 vis-à-vis de l'acide férulique (substrat majoritaire dans la pâte). De plus, ces deux enzymes semblent moins sensibles que les autres laccases testées à l'inhibition par le chlorure de sodium. L'enzyme PC a été partiellement purifiée par chromatographie d'échange d'ions (facteur de purification égal



## Conclusions et Perspectives

---

à 3) conduisant à la séparation de deux isoformes. La caractérisation physico-chimique a permis de confirmer les données de la littérature (point isoélectrique égal à 3,7 et masse molaire égale à 70 kDa). Le chlorure de sodium a un effet inhibiteur sur l'activité de cette enzyme en présence d'acide férulique. L'inhibition est de type compétitif ( $K_i = 3 \text{ mM}$ ). Pour l'enzyme K1, seule l'inhibition par le chlorure de sodium a été examinée. A pH 5,6 et vis-à-vis de l'ABTS, l'inhibition est de type non compétitif ( $K_i = 150 \text{ mM}$ ).

Après leur caractérisation biochimique, l'oxydation des composés phénoliques par la laccase PC a été étudiée en présence de mélanges de deux substrats dans le milieu réactionnel, à pH égal à 4 pour le mélange acide férulique (AF) – acide sinapique (AS) et à pH 5,6 pour le mélange AF-DOPA et AS-DOPA. Les résultats obtenus ont montré que les radicaux féruloyl générés lors de l'oxydation de l'AF permettent d'accélérer l'oxydation du second phénol dans le milieu tout en régénérant l'AF. Dans ces mélanges, l'AF jouerait un rôle de médiateur d'oxydation pour la L-DOPA. Il en est de même avec l'AS.

Lors de l'oxydation de l'ABTS par la laccase PC suivie par spectrophotométrie à pH = 5,6, l'ajout d'AF provoque une réduction rapide du radical  $\text{ABTS}^\circ$  formé. Dans ce cas, c'est l'ABTS qui joue un rôle de médiateur, celui-ci étant réputé pour être un très bon médiateur d'oxydation. Lors de la réduction du radical  $\text{ABTS}^\circ$  en ABTS, un nombre de moles d'ABTS $^\circ$  plus important que le nombre de moles d'AF introduit dans le milieu semble nécessaire. (stoechiométrie supérieure à 1). Enfin, l'ajout de tyrosine à un milieu contenant l'ABTS oxydé par la laccase PC ne provoque pas de réduction rapide du radical. En revanche, après un temps long (30 min) d'incubation, une coloration violette apparaît résultant probablement d'une interaction entre les molécules d'ABTS $^\circ$  et celles de tyrosine.

Dans la pâte, l'ajout des laccases PC et K1 engendre une augmentation de la consommation d' $\text{O}_2$ . Une modification des valeurs de couple est aussi observée, plus marquée à forte dose. Lors de test de panification préliminaire, l'ajout de laccase provoque une légère amélioration du volume du pain. En revanche, dès la dose de  $12 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ , l'apparition d'un fort collant est constatée, ainsi qu'un fort excès d'extensibilité, rendant les pâtes difficilement manipulables. L'effet de dépolymérisation des protéines provoqué par la laccase PC a été confirmé par l'analyse de l'état d'agrégation des protéines. Cet effet est renforcé en présence de levure (*S. cerevisiae*) et d'ABTS. Ce dernier semble par ailleurs régénéré puisqu'il est retrouvé libre dans les extraits protéiques. En conclusion, l'effet améliorant des laccases au sein de la pâte reste à confirmer. Cette enzyme est probablement responsable de phénomènes de suroxydation conduisant à la détérioration des propriétés rhéologiques des pâtes. L'utilisation de l'ABTS comme système médiateur modèle est par ailleurs intéressante,



puisque ce système permet de générer des radicaux libres, stables capables d'interagir avec les composés de la pâte tout en étant régénéré (pas de formation de dimères comme dans le cas de l'acide férulique).

De l'instrumentation du sitoxygraphe à la caractérisation des laccases, notre travail de thèse a abordé un grand nombre de problématiques et ouvert de nombreuses perspectives.

Tout d'abord, le sitoxygraphe permet l'acquisition de la température de pâte et de la température d'entrée et de sortie du fluide circulant dans le double enveloppe thermostatée. Par manque de temps, les données mesurées n'ont pu être exploitées. L'exploitation de ces dernières devraient permettre d'étudier les échanges énergétiques au cours du pétrissage (énergie fournie par le moteur, énergie absorbée par la pâte sous forme de chaleur, énergie dissipée dans le double paroi du pétrin).

Concernant l'instrumentation, l'apport de la mesure de pression ouvre une nouvelle voie de recherche sur l'évolution de la densité des pâtes. En effet, le calcul de la variation du nombre de moles de gaz dans l'enceinte et la mesure de pression permettent d'appliquer la loi des gaz parfaits en négligeant la variation de température de la phase gazeuse. Ainsi, il est possible de calculer le volume de phase gazeuse à chaque instant du pétrissage et par conséquent, le volume de pâte. Connaissant la masse de pâte introduite, il semble possible de mesurer l'évolution de sa densité au cours du pétrissage. De plus, en présence de levure (*S. cerevisiae*), il paraît possible de calculer la densité de la pâte au cours d'une fermentation en masse directement après le pétrissage. Enfin, lors de la fermentation (ou lorsque le bras du pétrin est arrêté en cours de pétrissage sans levure), l'évolution des pourcentages gazeux de la pâte au repos devrait permettre d'étudier les phénomènes de diffusion des gaz à travers la pâte (mesure de la porosité de celle-ci). Ainsi, l'effet de différentes formulations (ajout d'émulsifiants ou de lipase par exemple) modifiant la densité et la porosité de la pâte devrait pouvoir être mesuré pendant le pétrissage et la fermentation. Il paraît également possible de pétrir en sur ou sous pression.

Concernant les conditions de pétrissage, les résultats obtenus ont montré qu'il était envisageable d'adapter les conditions de pétrissage pour faciliter les comparaisons avec les appareils classiques de rhéologie par exemple (adaptation de l'hydratation des pâtes par exemple). La mesure simultanée de paramètres rhéologiques et oxydatifs sur le sitoxygraphe constitue un avantage certain pour faire étudier le comportement des farines au cours du pétrissage.



## *Conclusions et Perspectives*

---

Enfin, pour modéliser les courbes de consommation d'oxygène par des paramètres biochimiques explicatifs, il serait intéressant d'effectuer une analyse cinétique des évolutions des substrats oxydables au cours du pétrissage, ainsi que des activités enzymatiques extractibles et d'explorer les effets de composés secondaires (dosages des composés hématiniques par exemple). De même, une analyse cinétique de l'état d'agrégation des protéines semble intéressante, en distinguant les fractions solubles au SDS, des fractions insolubles. Ces analyses seraient également intéressantes pour les pâtes supplémentées en améliorants.

Enfin, la mise en évidence de l'effet médiateur de l'ABTS au sein de la pâte mérite de poursuivre les recherches sur les systèmes laccasiques, soit en testant de nouvelles enzymes, ou en cherchant des systèmes médiateurs naturels.





## 6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

---

- AFNOR, 1981. Céréales et produits de moutures. Détermination des cendres. Méthode par incinération à 900 °C. Association Française de Normalisation. NF V 03-720.
- AFNOR, 1998. Détermination de l'absorption d'eau et des caractéristiques rhéologiques au moyen du Farinographe. Association Française de Normalisation. NF V03-717-1.
- AFNOR, 2002. Essai de panification de type pain courant français. Association Française de Normalisation. NF V 03-716.
- AFNOR, 2003. Détermination des caractéristiques rhéologiques au moyen de l'alvéographe. Association Française de Normalisation. NF V03-717 - 4.
- AFNOR, 2004. Blés tendres, seigles et leurs farines, blés durs et leurs semoules – Détermination de l'indice de chute selon Hagberg–Perten. Association Française de Normalisation. NF V03-703 (NF ISO 3093).
- Ameille, V., 1998. Instrumentation d'un réacteur en vue de la modélisation des réactions d'oxydoréduction intervenant au cours du pétrissage des pâtes de farine de blé tendre. *Thèse de doctorat*, Université Paris VI, Paris. pp 182.
- Ameille, V., Castello, P., Garcia, R., Rakotozafy, L., Potus, J. et Nicolas, J., 2000a. Influence de l'ajout de glucose oxydase et de lipase sur l'évolution de la consistance et de la consommation d'oxygène de la pâte de farine de blé tendre au cours du pétrissage. *Sciences des Aliments*. **20** (4/5): 441-455.
- Ameille, V., Davidou, S., Drapron, R., Potus, J. et Nicolas, J., 2000b. Mesure en continu de la consommation d'oxygène de la pâte de farine de blé tendre au cours du pétrissage. *Sciences des Aliments*. **20**: 221-236.
- Arnaut, F., Contreras, R., Dauvrin, T., Vanneste, G., Viaene, J. et Géoris, J.C.E., 2006. Overexpressed and purified *Aspergillus ficuum* oxidase and nucleic acid encoding the same. WO/2006/029485, Belgium.
- Asther, M., Camarero, S., Colom, J.F., Martinez, A.T., Martinez, M.J., Perez-Boada, M., Record, E., Sigoillot, C., Sigoillot, J.-C. et Vidal, T., 2005. Comparaison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol.* **115**: 333-343.
- Baker, J.C. et Mize, M.D., 1946. Gas occlusion during dough mixing. *Cereal Chem.* **23**: 39-51.
- Baldrian, P., 2004. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63** (5): 560-563.
- Barone, R., Briante, R., D'Auria, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Del Giudice, L., Borrelli, G.M., Di Fonzo, N. et Nucci, R., 1999. Purification and characterization of a lipoxygenase enzyme from durum wheat semolina. *J. Agric. Food Chem.* **47** (5): 1924-1931.
- Barriere, F., Kavanagh, P. et Leech, D., 2006. A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. *Electrochimica Acta.* **51** (24): 5187-5192.
- Barron, C., Surget, A. et Rouau, X., 2007. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *J. Cereal Sci.* **45** (1): 88-96.
- Bartolucci, J.-C., 1997. Comportement rhéologique des pâtes et qualité des farines de blés tendres français en panification et en biscuiterie. *Thèse de doctorat*, ENSIA, Massy. pp 286
- Bartolucci, J.-C. et Launay, B., 2000. Stress relaxation of wheat flour doughs following bubble inflation or lubricated squeezing flow and its relation to wheat flour quality. In *Wheat structure biochemistry and functionality*. Schofield, J. P., eds., Royal Society of Chemistry. London, pp 323-331.
- Belton, P.S., 2005. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *J. Cereal Sci.* **41** (2): 203-211.
-

## Références bibliographiques

---

- Berland, S. et Launay, B., 1995. Rheological properties of wheat doughs in steady and dynamic shear : effect of water content and some additives. *Cereal Chem.* **72**: 48-52.
- Bialk, H.M., Simpson, A.J. et Pedersen, J.A., 2005. Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Environmental Science and Technology.* **39** (12): 4463-4473.
- Bloksma, A.H. et Nieman, W., 1975. The effect of temperature on some rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Texture Studies.* **6**: 343-361.
- Bonet, A., Rosell, C.M., Caballero, P.A., Gomez, M., Perez-Munuera, I. et Lluch, M.A., 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chem.* **99** (2): 408-415.
- Boussard, A., Avram-Vladislav, E., Potus, J. et Nicolas, J., 2004. Oxydation du glutathion et de l'alcool déshydrogénase en présence d'acide linoléique par la lipoxygénase de soja à différents pH. *Industries des Céréales.* **138**: 12-16.
- Brinch, D.S. et Pedersen, P.B., 2002a. Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* **35** (3): 296-307.
- Brinch, D.S. et Pedersen, P.B., 2002b. Toxicological studies on laccase from *Polyporus pinsitus* expressed in *Aspergillus oryzae*, intended for use in food. *Regulatory Additives and Contaminants.* **19**: 323-334.
- Brown, B.R., 1967. Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols. In *Oxidative coupling of phenols*. Taylor, W. I. et Batlersby, A. R., eds., Dekker. New York, **1**: pp 167-201.
- Burton, S.G., 2003. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* **21** (12): 543-549.
- Bushuk, W. et Khan K., 1979. Studies of Glutenin XII. Comparison by SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chem.*, **56**: 36-38.
- Caballero, P.A., Gomez, M. et Rosell, C.M., 2007. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *J. Food Engineer.* (sous presse).
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J. et Martinez, A.T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Env. Microbiol.* **71** (4): 1775-1784.
- Campbell, G.M., Herrero-Sanchez, R., Payo-Rodriguez, R. et Merchan, M.L., 2001. Measurement of dynamic dough density and effect of surfactants and flour type on aeration during mixing and gas retention during proofing. *Cereal Chem.* **78** (3): 272-277.
- Campbell, G.M., Rielly, C.D., Fryer, P.J. et Sadd, P.A., 1998. Aeration of bread dough during dough mixing : effect of mixing dough at reduced pressure. *Cereal Foods World.* **43** (3): 163-167.
- Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A.M., Messina, A. et Tarola, A.M., 2001. Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta.* **55** (1): 189-200.
- Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X. et Micard, V., 2005a. Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydrate Polymers.* **59** (2): 181-188.
- Carvajal-Millan, E., Guilbert, S., Morel, M.-H. et Micard, V., 2005b. Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties. *Carbohydrate Polymers.* **60** (4): 431-438.
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.H., Rouau, X., Doublier, J.L. et Micard, V., 2005c. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules.* **6** (1): 309-317.

## Références bibliographiques

---

- Castello, P., 1999. Utilisation des lipases en panification française (effets technologiques, modifications biochimiques et modalités d'emploi). *Thèse de Doctorat*, ENSIA, Université de Paris VII et de Paris IX, INA-PG, Paris, France. pp 158
- Castello, P., Potus, J., Baret, J.-L. et Nicolas, J., 1998. La maturation des farines : aspects biochimiques et technologiques. *Industries des Céréales*. **108**: 5-13.
- Celhay, F., 2000. Mesure en continu de paramètres rhéologiques, de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone au cours du pétrissage de pâtes boulangères. Influence de l'addition de substrats rédox et d'oxydoréductases exogènes. *Mémoire d'ingénieur*, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris. pp 138
- 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*, Université de Bourgogne, Dijon. pp 349
- Charun, E., Abecassis, J., Contamine, A.-S., Roulland, T.-M., Vergnes, B. et Morel, M.H., 2000. Effects of Temperature and Mechanical Input on Semisweet Biscuit (Cookie) Quality and Dough Characteristics (1). *Cereal Chem.* **77** (3): 265-271.
- Cheftel, J.C., Cheftel, H. et Besançon, P., 1977. Texture, propriétés colloïdales, rhéologie. *In Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*. Lavoisier, T. e. d., eds. Paris, **2**: pp 49-66.
- Chin, N.L. et Campbell, G.M., 2005a. Dough aeration and rheology: Part 1. Effects of mixing speed and headspace pressure on mechanical development of bread dough. *J. Sci. Food Agric.* **85** (13): 2184-2193.
- Chin, N.L. et Campbell, G.M., 2005b. Dough aeration and rheology: Part 2. Effects of flour type, mixing speed and total work input on aeration and rheology of bread dough. *J. Sci. Food Agric.* **85** (13): 2194-2202.
- Chin, N.L., Campbell, G.M. et Thompson, F., 2005a. Characterisation of bread doughs with different densities, salt contents and water levels using microwave power transmission measurements. *J. Food Engineer.* **70** (2): 211-217.
- Chin, N.L., Martin, P.J. et Campbell, G.M., 2005b. Dough aeration and rheology: Part 3. Effect of the presence of gas bubbles in bread dough on measured bulk rheology and work input rate. *J. Sci. Food Agric.* **85** (13): 2203-2212.
- Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.* **35** (1-2): 93-96.
- Contamine, A.-S., Abecassis, J., Morel, M.H., Vergnes, B. et Verel, A., 1995. Effect of Mixing Conditions on the Quality of Dough and Biscuits. *Cereal Chem.* **72** (6): 516-522.
- Couteau, D. et Mathaly, P., 1997. Purification of ferulic acid by adsorption after enzymic release from a sugar-beet pulp extract. *Ind. Crops Prod.* **6** (3-4): 237-252.
- Darde, O., 2001. Influences de la quantité, de la masse moléculaire et de la conformation des macropolymères gluténiques sur la qualité technologique des farines panifiables de blé tendre (*triticum aestivum*). *Thèse de doctorat*, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse, France. pp 172
- Davidou, S., Michon, C., Ben Thabet, I. et Launay, B., 2007. Influence of shaping on the rheological properties. *Cereal Chem.* (sous presse).
- Dec, J. et Bollag, J.-M., 1990. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Archives Environ. Contamination Toxicol.* **19**: 543-550.
- Delcros, J.F., Rakotozafy, L., Boussard, A., Davidou, S., Porte, C., Potus, J. et Nicolas, J., 1998. Effect of mixing conditions on the behaviour of lipoxygenase, peroxidase and catalase in wheat flour doughs. *Cereal Chem.* **75** (1): 85-93.

## Références bibliographiques

---

- DeLean, A., Munson, P. et Rodbard, D., 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* **235** (2): E97-102.
- Dobraszczyk, B.J., 2005. Adding to the mix. *New Food* (3): 16-20.
- Dobraszczyk, B.J. et Morgenstern, M.P., 2003. Rheology and the breadmaking process. *J. Cereal Sci.* **38** (3): 229-245.
- Dobraszczyk, B.J. et Roberts, A., 1994. Strain hardening and dough gas cell-wall failure in biaxial extension. *J. Cereal Sci.* **20**: 265-274.
- Dupuis, B., 1997. The chemistry and toxicology of potassium bromate. *Cereal Foods World.* **42**: 171-183.
- Duran, N. et Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental.* **28** (2): 83-99.
- Eggert, C., Temp, U. et Eriksson, K.E., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Env. Microbiol.* **62** (4): 1151-1158.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. et Carrondo, M.A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A Laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278** (21): 19415-19425.
- Every, D., Simmons, L.D. et Ross, M.P., 2006. Distribution of redox enzymes in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chem.* **83** (1): 62-68.
- Eyoum, A., 2002. Etude de quelques facteurs influençant la consommation d'oxygène de la pâte de farine de blé au cours du pétrissage : origine variétale de la farine, vitesse de pétrissage, ajout d'acide linoléique et / ou lipoxygénase. *Mémoire d'ingénieur*, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris. pp 86
- Eyoum, A., Celhay, F., Neron, S., El Amrani, F., Poiffait, A., Potus, J., Baret, J.-L. et Nicolas, J., 2003. Biochemical factors of importance in the oxygen consumption of unyeasted wheat flours during dough mixing. In *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing*. Courtin, M., Veraverbeke, W. S. et Delcour, J., eds., Faculty of agricultural and applied biological sciences. Leuven, Belgium, pp 303-309.
- Fabbrini, M., Galli, C. et Gentili, P., 2002. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **18** (1-3): 169-171.
- Faisy, F. et Fischer, J., 2002. L'essai de panification « Pain courant français » enfin normalisé. *Industries des Céréales.* **129**: 25-30
- Feillet, P., 2000. Le grain de blé, composition et utilisation. INRA. Paris, INRA
- Feillet, P., Autran, J.C. et Icard-Verniere, C., 2000. Pasta brownness : an assessment. *J. Cereal Sci.* **32**: 215-233.
- Figueroa-Espinoza, M.-C., Morel, M.-H. et Rouau, X., 1998a. Effect of lysine, tyrosine, cysteine, and glutathione on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase. *J. Agric. Food Chem.* **46** (7): 2583-2589.
- Figueroa-Espinoza, M.C., Morel, M.-H., Surget, A., Asther, M., Moukha, S., Sigoillot, J.-C. et Rouau, X., 1999a. Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocol.* **13** (1): 65-71.
- Figueroa-Espinoza, M.C., Morel, M.-H., Surget, A. et Rouau, X., 1999b. Oxidative cross-linking of wheat arabinoxylans by manganese peroxidase. Comparison with laccase and horseradish peroxidase. Effect of cysteine and tyrosine on gelation. *Journal of the Science of Food Agriculture.* **79**: 460-463.
- Figueroa-Espinoza, M.C., Morel, M.H. et Rouau, X., 1998b. Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase. Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal chemistry.* **75**: 259-265.
-



## Références bibliographiques

---

- Figueroa-Espinoza, M.C., Morel, M.H. et Rouau, X., 1998c. Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase. Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chem.* **75**: 259-265.
- Figueroa-Espinoza, M.C. et Rouau, X., 1999. Effect of cysteinyl caffeic acid, caffeic acid, and L-Dopa on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase. *J. Agric. Food Chem.* **47** (2): 497-503.
- Fuerst, E.P., Anderson, J.V. et Morris, C.F., 2006. Polyphenol oxidase in wheat grains : whole kernel and bran assays for total and soluble activity. *Cereal Chem.* **83**: 10-16.
- Gao, L. et Bushuk, W., 1992. Structure of glutenin based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chem.* **69**: 452-455.
- Garcia, R., 2000. Etude de trois systèmes enzymatiques d'oxydoréduction - catalase, peroxydase et glucose oxydase - pris isolément et en mélange, susceptibles d'intervenir en technologie de la panification. *Thèse de doctorat*, Université de Paris VII - Denis Diderot, Paris. pp 189
- Garcia, R., Kaid, N., Vignaud, C. et Nicolas, J., 2000. Purification and some properties of catalase from wheat germ (*Triticum aestivum*). *J. Agric. Food Chem.* **48** (4): 1050-1057.
- Garcia, R., Rakotozafy, L. et Nicolas, J., 2004. Analysis and modeling of the ferulic acid oxidation by a glucose oxidase-peroxidase association. Comparison with a hexose oxidase-peroxidase association. *J. Agric. Food Chem.* **52** (12): 3946-3953.
- Garcia, R., Rakotozafy, L., Telef, N., Potus, J. et Nicolas, J., 2002a. Oxidation of Ferulic Acid or Arabinose-Esterified Ferulic Acid by Wheat Germ Peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50** (11): 3290-3298.
- Garcia, R., Rakotozafy, L., Telef, N., Potus, J. et Nicolas, J., 2002b. Oxidation of ferulic acid or arabinose-esterified ferulic acid by wheat germ peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3290-3298.
- Garzillo, A.M.V., Colao, M.C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D. et Buonocore, V., 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** (5): 545-551.
- Gianfreda, L., Xu, F. et Bollag, J.-M., 1999. Laccases : A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.* **3**: 1-25.
- Godon, B. et Loisel, W., 1997. Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. Paris, Lavoisier, Technique et documentation. pp 820.
- Goupy, J., 2000. Modélisation par les plans d'expériences. In *Techniques de l'ingénieur*. eds. pp 1-23.
- Grant, D.R., 1974. Studies of the role of ascorbic acid in chemical dough development. I. Reaction of ascorbic acid with flour water suspension. *Cereal Chem.* **51**: 684.
- Graveland, A., Bosfeld, P., Lichtendonk, W.J., Marseille, J.P. et Moonen, J.H.E., 1985. A model for the molecular structure of the glutenin from wheat flour. *J. Cereal Sci.* **3**: 1-16.
- Grosch, W., 1986. Redox systems in dough. In *The chemistry and physics of baking : Materials, processes and products*. Blanchard, J. M., Frazier, P. J. et Galliard, T., eds., Royal society of chemists. London, pp 155-159.
- Grosch, W. et Wieser, H., 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *J. Cereal Sci.* **29** (1): 1-16.
- Guinet, R., 1978. Technologies de panification. *Bulletin de l'école française de meunerie.* **287**: 227-238.
- Hamer, R.J. et Van Vliet, T., 2000. Understanding the structure and properties of gluten: an overview In *Wheat Gluten - Proceedings of the 7th International Workshop Gluten*. Shewry, P. R. et Tatham, A. S., eds., Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp 125-131.
-

## Références bibliographiques

---

- Hanft, F. et Koehler, P., 2005. Quantitation of dihydroxyacetone in wheat flour and dough by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **53** (7): 2418-2423.
- Hanft, F. et Koehler, P., 2006. Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *J. Sci. Food Agric.* (sous presse).
- Hawthorn, J. et Todd, J.P., 1955. Catalase in relation to the unsaturated-fat oxidase activity in wheat flour. *Chem. Ind.* **april 1955**: 446-447.
- Hlynka, I., 1962. Influence of temperature, speed of mixing and salt on some rheological properties of dough farinograph. *Cereal Chem.* **39**: 286-303.
- Hoseney, R.C., 1994. Principles of cereal science and technology. Saint Paul, Minnesota, American Association of cereal chemists
- Hoseney, R.C. et Faubion, J.M., 1981. A mechanism of oxidative gelation of wheat flour water-soluble pentosans. *Cereal Chem.* **58**: 412-424.
- Hoseney, R.C., Rao, P.H., Faubion, J.M. et Sidhu, J.S., 1980. Mixograph studies. 4. The mechanism by which lipoxygenase increase mixing tolerance. *Cereal Chem.* **74**: 781-785.
- Irvine, G.N., Bushuk, W. et Anderson, J.A., 1954. Kinetic studies of the catalase system of wheat. *Cereal Chem.* **31**: 256-266.
- Ishii, T., 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides *Plant Sci.* **127**: 111-127.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G. et Bushuk, W., 1991. Physical properties of water soluble pentosans from different wheat varieties. *Cereal Chem.* **68**: 145-150.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. et Nicolas, J., 1990. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **38** (7): 1437-1441.
- Jeanneau, A., 2005. Etude sur la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*. *Master*, Université Pierre et Marie Curie, Paris. pp 55
- Johannes, C. et Majcherczyk, A., 2000a. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.* **78** (2): 193-199.
- Johannes, C. et Majcherczyk, A., 2000b. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Env. Microbiol.* **66**: 524-528.
- Junge, R.C., Hoseney, R.C. et Varriano-Marston, E., 1981. Effect of surfactants on air incorporation in dough and the crumb deformation and rupture properties in simple tension. *Cereal Chem.* **58**: 338-342.
- Kasarda, D.D., 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. *In Wheat is unique: structure, composition, processing, end-use properties and products.* Pomeranz, Y., eds., AACC. St Paul, Minnesota, USA.
- Khan, K. et Bushuk, W., 1979. Studies of glutenin XII. Comparison by SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chem.* **56**: 36-38.
- Kieffer, R., Wieser, H., Henderson, M.H. et Graveland, A., 1998. Correlations of the Breadmaking Performance of Wheat Flour with Rheological Measurements on a Micro-scale. *J. Cereal Sci.* **27** (1): 53-60.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. et Taniguchi, H., 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **50** (7): 2161-2168.
- Kilborn, R.H. et Tipples, K.H., 1972. Factors affecting mechanical dough development. Effect of mixing intensity and work input. *Cereal Chem.* **49**: 34-47.
- Knutson, K. et Ragauskas, A., 2004. Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog.* **20** (6): 1893 -1896.
- Kobayashia, S. et Higashimurab, H., 2003. Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science.* **28**: 1015-1048.
-



## Références bibliographiques

---

- Koehler, P., 2003a. Concentrations of low and high molecular weight thiols in wheat dough as affected by different concentrations of ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* **51** (17): 4948-4953.
- Koehler, P., 2003b. Effect of ascorbic acid indough: reaction of oxidized glutathione with reactive thiol groups of wheat glutelin. *J. Agric. Food Chem.* **51** (17): 4954-4959.
- Kuninori, T., Nishiyama, J. et Matsumoto, H., 1976. Effect of mushroom extract on the physical properties of dough. *Cereal Chem.* **77**: 823-828.
- Labat, E., Morel, M. et Rouau, X., 2000a. Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs. *Cereal Chem.* **77** (6): 823-828.
- Labat, E., Morel, M.H. et Rouau, X., 2000b. Wheat gluten phenolic acids: Occurrence and fate upon mixing. *J. Agric. Food Chem.* **48** (12): 6280-6283.
- Labat, E., Morel, M.H. et Rouau, X., 2001. Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. *Food Hydrocol.* **15** (1): 47-52.
- Lacki, K. et Duvnjak, Z., 1996. Transformation of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid and its derivatives using enzyme from white-rot fungus *Trametes versicolor*: Enzyme characteristics and its application. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **65** (3): 211-220.
- Lee, S.-K., George, S.D., Antholine, W.E., Hedman, B., Hodgson, K.O. et Solomon, E.I., 2002. Nature of the intermediate formed in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of the American Chemical Society.* **124** (21): 6180-6193.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E. et Remesy, C., 2006a. Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties. *Eur. J. Agron.* **25** (2): 170-176.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E. et Remesy, C., 2006b. Wheat Lipoxygenase Activity Induces Greater Loss of Carotenoids than Vitamin E during Breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* **54** (5): 1710-1715.
- Levavasseur, L., Rakotozafy, L., Manceau, E., Louarme, L., Robert, H., Baret, J.-L., Potus, J. et Nicolas, J., 2006. Discrimination of wheat varieties by simultaneous measurements of oxygen consumption and consistency of flour dough during mixing. *J. Sci. Food Agric.* **86** (11): 1688-1698.
- Liavonchanka, A. et Feussner, I., 2006. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J. Plant Physiol.* **163** (3): 348-357.
- Lindsay, M.P. et Skerritt, J.H., 1998. Examination of the structure of the glutenin macropolymer in wheat flour and doughs by stepwise reduction. *J. Agric. Food Chem.* **46** (9): 3447-3457.
- Louarme, L., 2001. Etude du mécanisme d'action du Bromate de potassium en panification en vue de le remplacer par une oxydoréductase : la sulfhydryle oxydase. *Thèse de doctorat*, Université de Paris-Sud, Paris. pp 168
- Louarme, L., Rakotozafy, L., Potus, J. et Nicolas, J., 2004. Dosage des acides cinnamiques présents dans différentes farines de blé tendre. *Industries des Céréales.* **142**: 25.
- Macosko, C.W., 1994. Rheology. Principles, measurements and applications. New York, USA, VCH Publishers.550.
- Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C. et Beckerich, J.-M., 2005. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research.* **5** (6-7): 635-646.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. et Hüttermann, A., 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enz. Microb. Technol.* **22**: 335-341.
-

## Références bibliographiques

---

- Malet, S., 2005. Effet d'un auxiliaire technologique sur les propriétés des pâtes de farine de blé : analyse de la structuration des macromolécules et comportement rhéologique. *Mémoire d'ingénieur*, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris. pp 103
- Matheis, G. et Whitaker, J.R., 1984. Peroxidase-catalysed cross-linking of proteins. *J. Prot. Chem.* **3**: 35-48.
- Melcion, J.P., 1991. Caractéristiques physiques de l'état divisé. In *Les industries de premières transformation des céréales*. Godon, B. et Willm, C., eds., Lavoisier, Technique et documentation. Paris, pp 157-176.
- Micard, V. et Thibault, J.-F., 1999. Oxidative gelation of sugar-beet pectins : use of laccase and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydrate Research*. **39**: 265-273.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. et Duran, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **13** (6-7): 205-216.
- Morel, M.-H., Bonicel, J., Micard, V. et Guilbert, S., 2000a. Protein insolubilization and thiol oxidation in sulfite-treated wheat gluten films during aging at various temperatures and relative humidities. *J. Agric. Food Chem.* **48** (2): 186-192.
- Morel, M.-H., Dehlon, P., Autran, J.C., Leygue, J.P. et Bar-L'Helgouac'h, C., 2000b. Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* **77** (5): 685-691.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B. et Girardin, M., 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Res. Internat.* (sous presse).
- Neukom, H. et Markwalder, H.U., 1978. Oxidative gelation of wheat flour pentosans : a new way for cross-linking polymers. *Cereal Foods World*. **23**: 374-376.
- Nicolas, J., 1978. Effets de différents paramètres sur la destruction des pigments caroténoïdes de la farine de blé tendre au cours du pétrissage. *Ann. Technol. Agric.* **27** (3): 695-713.
- Nicolas, J., 1979. Mise au point sur l'action d'enzymes d'oxydoréduction en technologie boulangère. La maturation des farines de blé tendre et le pétrissage des pâtes. *Ann. Technol. Agric.* **28**: 445-468.
- Nicolas, J., Billaud, C., Rouet Mayer, M.A. et Philipon, J., 2003. Enzymatic browning. 1. Biochemical aspects. In *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Caballero, B., Trugo, L. et Finglas, P. M., eds., Academic Press. London, **1**: pp 678-686.
- Nicolas, J., Cheynier, V., Fleuriet, A. et Rouet Mayer, M.A., 1993. Polyphenols and enzymatic browning. In *Polyphenolic phenomena*. INRA, eds., INRA. Versailles, France, pp 165-175.
- Nicolas, J. et Drapron, R., 1981. Les lipoxygénases végétales, état actuel de nos connaissances. Aspects biochimiques. *Sciences des Aliments*. **1** (1): 91-168.
- Nicolas, J. et Drapron, R., 1983. Lipoxygenase and some related enzymes in breadmaking. In *Lipids in cereal technology*. Barnes, P. J., eds., Academic Press. London, pp 213-235.
- Nicolas, J. et Potus, J., 1994. Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydations. Exemples du rôle de la lipoxygénase en panification et de la polyphénoloxydase en technologie des fruits. *Sciences des Aliments*. **14**: 627-642.
- Nicolas, J., Potus, J., Garcia, R. et Davidou, S., 2007. Wheat redox enzymes. In *Wheat chemistry and technology*. Pomeranz, Y., eds., American association of cereal chemists. (sous presse).
- Otterbein, L., Record, E., Chereau, D., Herpoël, I., Asther, M. et Moukha, S.M., 2000. Isolation of a new laccase isoform from the white-rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus* strain ss3. *Can. J. Microbiol.* **46** (8): 759-763.

## Références bibliographiques

---

- Oudgenoeg, G., Dirksen, E., Ingemann, S., Hilhorst, R., Gruppen, H., Boeriu, C.G., Piersma, S.R., van Berkel, W.J.H., Laane, C. et Voragen, A.G.J., 2002. Horseradish peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid on a template of a tyrosine-containing tripeptide. *J. Biol. Chem.* **277**: 21332-21340.
- Oudgenoeg, G., Hilhorst, R., Piersma, S.R., Boeriu, C.G., Gruppen, H., Hensing, M., Voragen, A.G.J. et Laane, C., 2001. Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine containing peptide with ferulic acid. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2503-2510.
- Piber, M. et Koehler, P., 2005. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* **53** (13): 5276-5284.
- Potus, J., 1997. Etude de réactions enzymatiques d'hydrolyse et d'oxydation intervenant au cours du pétrissage des pâtes de farine de blé tendre. *Habilitation à diriger les recherches*, Université de Bourgogne, Paris. pp 156
- Potus, J. et Drapron, R., 1991. De la qualité dans la filière blé, farine, pain. *Supplément de la revue Industries des Céréales*: 5-23.
- Potus, J., Drapron, R. et Rakotozafy, L., 1992. Rôle de l'eau sur les interactions moléculaires conduisant à la formation des pâtes de farine de blé. *Industries des Céréales.* **79**: 13-21.
- Potus, J., El Amrani, F., Ameille, V. et Kaid, N., 1996. Les hydrolases en panification. *Industries des Céréales.* **96**: 7-12.
- Potus, J., Poiffait, A. et Drapron, R., 1994. Influence of dough-making conditions on the concentration of individual sugars and their utilization during fermentation. *Cereal Chem.* **71**: 505-508.
- Preston, K.R., 1981. Effect of neutral salts upon wheat gluten proteins properties. I. Relationship between hydrophobic properties of gluten and their extractibility and turbidity in neutral salts. *Cereal Chem.* **58**: 317-324.
- Primo-Martín, C., Martínez-Anaya, M. et Collar, C., 2004. Composition of the glutenin macropolymer: effects of flour quality and nonamylolytic enzyme addition. *European Food Research and Technology.* **218** (5): 428-436.
- Primo-Martin, C., Valera, R. et Martinez-Anaya, M.A., 2003. Effect of pentosanase and oxidases on the characteristics of doughs and the glutenin macropolymer (GMP). *J. Agric. Food Chem.* **51** (16): 4673-4679.
- Rakotozafy, L., Doussot, J., Falguières, A., Guy, A. et Nicolas, J.J., 2004a. Etude de l'oxydation in vitro des déhydrodimères de l'acide férulique par les peroxydases purifiées du germe de blé et la peroxydase de Raifort. *Industries des Céréales.* **138**: 16-18.
- Rakotozafy, L., Falguières, A., Doussot, J., Guy, A. et Nicolas, J. (2004b). Absorption spectra of ferulic acid and its dehydrodimers. Is-db (The International Spectroscopic Data Bank) : Paris data deposition festival, Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA P-G), Paris, France.
- Rakotozafy, L., Mackova, B., Delcros, J.F., Boussard, A., Davidou, S., Potus, J. et Nicolas, J., 1999. Effect of adding exogenous oxidative enzymes on the activity of three endogenous oxidoreductases during mixing of wheat flour dough. *Cereal Chem.* **76** (2): 213-218.
- Rani, K.U., Prasada Rao, U.J.S., Leelavathi, K. et Haridas Rao, P., 2001. Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. *J. Cereal Sci.* **34** (3): 233-242.
- Rasiah, I.A., Sutton, K.H., Low, F.L., Lin, H.-M. et Gerrard, J.A., 2005. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chem.* **89** (3): 325-332.
-

## Références bibliographiques

---

- Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., Cees, A.M., Van Den Hondel, J.J. et Asther, M., 2002. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **269**: 602-609.
- Richard-Forget, F.C., Rouet-Mayer, M.A., Goupy, P.M., Philippon, J. et Nicolas, J., 1992. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **40** (11): 2114-2122.
- Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24** (5): 219-226.
- Robert, H., 2001. Caractérisation de la laccase de *Trametes versicolor* et étude de son action sur des effecteurs présents dans la farine de blé. *mémoire de DEA*, Ensia, Massy, Paris. pp
- Robles, A., Lucas, R., Alvarez de Cienfuegos, G. et Galvez, A., 2000. Phenol oxidase (laccase) activity in strains of the hypomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enz. Microb. Technol.* **26**: 484-490.
- Rodriguez-Mateos, A., Millar, S.J., Bhandari, D.G. et Frazier, R.A., 2006. Formation of dityrosine cross-links during breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* **54** (7): 2761-2766.
- Rouau, X., 1996. Les hémicellulases en panification. *Industrie des céréales.* **96**: 13-19.
- Rouau, X., El-Hayek, M.L. et Moreau, D., 1994. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread making quality of flours in relation to changes in pentosane properties. *J. Cereal Sci.* **19**: 259-272.
- Roussel, P. et Chiron, H., 2002. Les pains français - Evolution, qualité, production. MAE-ERTI. Vesoul, Science et Technologie des métiers de bouche.433.
- Roussel, P., Chiron, H., Ndaye, A. et Della Valle, G., 2006a. Vers une harmonisation du langage sensoriel dans la filière blé-farine-pain. Méthodologie de communication appliquée à un système d'aide à la décision en panification française (AsCoPain) - 1ère partie. *Industries des Céréales.* **149**: 24-31.
- Roussel, P., Chiron, H., Ndaye, A. et Della Valle, G., 2006b. Vers une harmonisation du langage sensoriel dans la filière blé-farine-pain. Méthodologie de communication appliquée à un système d'aide à la décision en panification française (AsCoPain) - 2ème partie. *Industries des Céréales.* **150**: 16-21.
- Schliephake, K., Mainwaring, D.E., Lonergan, G.T., Jones, I.K. et Baker, W.L., 2000. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enz. Microb. Technol.* **27** (1-2): 100-107.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A. et Autio, K., 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J. Cereal Sci.* **43** (2): 152-159.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M. et Mifflin, B.J., 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins : a reassessment. *J. Cereal Sci.* **4**: 97-106.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T. et Gorton, L., 2006. Laccase-based biosensors for monitoring lignin. *Enz. Microb. Technol.* **39** (4): 835-840.
- Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Morozova, O.V., Khohlov, P.S., Gazaryan, I.G. et Yaropolov, A.I., 2006. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. *Bioelectrochem.* **69** (1): 16-24.
- Si, J.Q., 1994. Use of laccase in baking. WO 94/28728, Denmark.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Colom, J.F. et Martinez, A.T., 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol.* **115** (4): 333-343.
-



## Références bibliographiques

---

- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.-L., Levasseur, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A., Fournel, A., Sigoillot, J.C. et Asther, M., 2003. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 346-352.
- Sliwinski, E.L., Hoef, F.v.d., Kolster, P. et Vliet, T.v., 2004a. Large-deformation properties of wheat dough in uni- and biaxial extension. Part II. Gluten dough. *Rheologica Acta.* **V43** (4): 321-332.
- Sliwinski, E.L., Kolster, P. et Vliet, T.v., 2004b. Large-deformation properties of wheat dough in uni- and biaxial extension. Part I. Flour dough. *Rheologica Acta.* **V43** (4): 306-320.
- Smith, D.E. et Andrews, J.S., 1957. The uptake of oxygen by flour dough. *Cereal Chem.* **34**: 323-336.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. et Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochem.* **150**: 76-85.
- Srebotnik, E. et Hammel, K.E., 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* **81** (2-3): 179-188.
- Surel, O., Darde, O., Tea, I., Violleau, F. et Kleiber, D., 2006. Suivi de la solubilisation des protéines par le SDS au cours du pétrissage : comparaison de trois pétrins. *Sciences des Aliments.* **26** (3): 247-258.
- Takasaki, S. et Kawakishi, S., 1997. Formation of protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine as new cross-linkers in gluten. *J. Agric. Food Chem.* **45** (9): 3472-3475.
- Tilley, K.A., Benjamin, R.E., Bagorogoza, K.E., Okot-Kotber, B.M., Prakash, O. et Kwen, H., 2001. Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function. *J. Agric. Food Chem.* **49** (5): 2627-2632.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. et Le Borgne, S., 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental.* **33**: 47-54.
- Tsen, C.C. et Hlynka, I., 1962. The role of lipids in oxidation of sulfhydryl groups in dough. *Cereal Chem.* **39**: 209-219.
- Valtorta, N., 2000. Les lipoxygénases de l'orge germée et leur intervention dans l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Effet du peroxyde d'hydrogène et de traitements thermiques, interférence des peroxydases. *Mémoire d'ingénieur*, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris. pp 96
- Vemulapalli, V. et Hosney, R.C., 1998. Glucose oxidase in breadmaking systems. *Cereal Chem.* **75**: 439-442.
- Wang, M., Hamer, R.J., van Vliet, T., Gruppen, H., Marseille, H. et Weegels, P.L., 2003. Effect of Water Unextractable Solids on Gluten Formation and Properties: Mechanistic Considerations. *J. Cereal Sci.* **37** (1): 55-64.
- Wang, M., Hamer, R.J., Van Vliet, T. et Oudgenoeg, G., 2002. Interaction of water extractable pentosans with gluten protein : effect on dough properties and gluten quality. *J. Cereal Sci.* **36**: 25-37.
- Wang, M., Vliet, T.v. et Hamer, R.J., 2004. Evidence that pentosans and xylanase affect the re-agglomeration of the gluten network. *J. Cereal Sci.* **39** (3): 341-349.
- Weegels, P.L., Hamer, R.J. et Schofield, J.D., 1997. Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. II. Changes in composition. *J. Cereal Sci.* **25** (2): 155-163.
- Weegels, P.L., Van de Pijpekamp, A.M., Graveland, A., Hamer, R.J. et Schofield, J.D., 1996. Depolymerisation and Re-polymerisation of Wheat Glutenin During Dough Processing. I. Relationships between Glutenin Macropolymer Content and Quality Parameters. *Journal of Cereal Science.* **23** (2): 103-111.
-

## Références bibliographiques

---

- Xu, F., 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. **35** (23): 7608-7614.
- Xu, F., 2005. Applications of oxidoreductases: recent progress. *Ind. Biotechnol.* **1**: 38–50.
- Xu, F., Deussen, H.-J.W., Lopez, B., Lam, L. et Li, K., 2001. Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds: Redox potential, electron-transfer kinetics and radical stability. *Eur. J. Biochem.* **268** (15): 4169-4176.
- Zawitowski, J., Biliaderis, C.G. et Eskin, N.A.M., 1991. Polyphenol oxidase. In *Oxidative enzymes in foods*. Robinson, D. S. et Eskin, N. A. M., eds., Elsevier Applied Science Chemistry. London, pp 217-273.
- Zille, A., Munteanu, F.-D., Gubitz, G.M. et Cavaco-Paulo, A., 2005. Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **33** (1-2): 23-28.

---

## Liste des figures

- Figure 1 Effet de l'activité de l'eau et de la température sur les activités enzymatiques (d'après Potus, 1997)
- Figure 2. Etapes générales de la panification
- Figure 3. Exemple de forme de bras de pétrin oblique (A.), spirale (B.) et horizontal (sitoxigraphe, C.)
- Figure 4 Grille de notation utilisée pour l'appréciation de la pâte dans le cadre de norme AFNOR (NF V 03-716)
- Figure 5 Appréciation manuelle de la qualité d'une pâte lors du pétrissage
- Figure 6 Etablissement de liens entre les différentes méthodes d'analyse de la texture des pâtes (d'après Roussel *et al.*, 2006a)
- Figure 7. Les différents types de sollicitations mécaniques
- Figure 8. Représentation schématique d'un appareil de mesure de rhéologie dynamique
- Figure 9. Courbe obtenue avec un rhéomètre dynamique
- Figure 10. Calcul des grandeurs rhéologiques en extension biaxiale par compression en conditions lubrifiées (CCL), d'après Bartolucci (1997)
- Figure 11. Courbe de compression relaxation obtenue au texturomètre (Bartolucci, 1997)
- Figure 12. Photographie des frasseur du farinographe<sup>®</sup> de brabender
- Figure 13. Exemple de farinogramme
- Figure 14. Exemple de courbe de couple obtenue avec le mixographe
- Figure 15. Exemple de courbe obtenue au consistographe<sup>®</sup> de Chopin
- Figure 16. Schéma de principe du pétrin instrumenté par Chin et Campbell (2005a)
- Figure 17. Principe de fonctionnement du rhéofermentomètre
- Figure 18. Exemples de courbes obtenues au rhéofermentomètre. A. courbe de développement. B. courbes de dégagement gazeux (débit de gaz en fonction du temps) obtenues en piégeant le CO<sub>2</sub> libéré ou non
- Figure 19. Structure de l'amylose et de l'amylopectine (d'après Feillet, 2000)
- Figure 20. Organisation supra-moléculaire du granule d'amidon (d'après Feillet, 2000)
- Figure 21. Structure chimique des arabinoxylanes de blé (d'après Fincher et Stone, 1986)
- Figure 22. Effet la teneur en eau et de l'état de l'amidon sur la température de transition vitreuse
- Figure 23. Exemple de liaison covalente entre des résidus d'acide férulique reliant deux chaînes d'arabinoxylanes
- Figure 24. Réactions proposées pour expliquer l'action de l'AF en présence ou non de laccase pendant le pétrissage (Labat, 2000).
- Figure 25. Classification des protéines selon Osborne (1907) et Shewry (1986). (d'après Feillet, 2000)
- Figure 26. Composition en lipides libres et liés de la farine (d'après Feillet, 2000)
- Figure 27. Principaux acides phénoliques contenus dans la farine
- Figure 28. Principaux dimères d'acide férulique présents dans la farine et dans la pâte
- Figure 29. Structure du trimère d'AF (d'après Rouau *et al.*, 2003)
- Figure 30. Schéma des échanges thiols/disulfures intervenant dans la pâte lors du pétrissage (d'après Potus, 1997).

## Liste des figures

- Figure 31. Mécanisme d'oxydation catalysée par la LOX (EC 1.13.11.12), d'après Liavonchanka et Feussner, 2006
- Figure 32. Hypothèse sur les échanges thiols/disulfures engendrés par l'action de la peroxydase sur les pentosanes (d'après Garcia, 2000)
- Figure 33. Mécanisme proposé par Grosch et Wieser (1999) pour expliquer l'effet améliorant du L-thréo-AA dans la pâte
- Figure 34. Réactions catalysées par les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1). Oxydations des monophénols et des o-diphénols
- Figure 35. Réactions catalysées par les laccases (EC 1.10.3.2). Oxydation des o-diphénols et des p-diphénols
- Figure 36. Ensemble des réactions d'oxydoréductions faisant intervenir l'oxygène dans la pâte de farine de blé tendre (d'après Potus, 1997)
- Figure 37. Positionnement des quatre atomes de cuivre dans le site actif de laccase de *B.subtilis* (adapté de Enguita, 2003)
- Figure 38. Mécanisme réactionnel des laccases au niveau de leur site actif adapté de Riva, 2006)
- Figure 39. Radicaux féruloyl formés lors de l'oxydation de l'AF (d'après Carunchio *et al.*, 2001)
- Figure 40. Mécanisme d'oxydation des systèmes laccase/médiateur (d'après Fabbrini, 2002)
- Figure 41. Structure chimique des principaux médiateurs synthétiques
- Figure 42. Evolution de la résistance à l'extension d'une pâte de farine selon la quantité de laccase ajoutée (d'après Si, 1994)
- Figure 43. Effet de la dose ( $5 - 200 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) de laccase semi-purifiée de *Trametes hirsuta* sur la résistance à l'extension ( $R_{\text{max}}$ , B) et l'extensibilité (E(x)), (Selinheimo *et al.*, 2006)
- Figure 44. Effet de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* sur une solution d'arabinoxylanes (0,2 % w/v). (Figueroa-Espinoza et Rouau., 1998)
- Figure 45. Hypothèse sur l'action des radicaux feruloyl générés lors de l'oxydation des arabinoxylanes par la laccase (d'après Figueroa-espinoza *et al.*, 1998)
- Figure 46. Modification de la répartition de la taille des polymères de protéines au cours du pétrissage, évaluée par le rapport des gluténines de haut poids moléculaire sur gluténines de faible poids moléculaires (F1/F2) (Labat, 2000)
- Figure 47. Réactions proposées pour expliquer l'action de l'AF en présence ou non de laccase pendant le pétrissage (Labat, 2000)
- Figure 48. Photo (vue de face) du sitoxygraphe instrumenté
- Figure 49. Photo (vue de diagonale) du sitoxygraphe instrumenté
- Figure 50. Principe de l'échantillonnage de pâte pendant le pétrissage
- Figure 51. Position relative des bras dans la cuve du sitoxygraphe (vue de face)
- Figure 52. Positionnement des capteurs et acquisition des données mesurées sous le logiciel Labview®
- Figure 53. Photographie de la cuve du pétrin bioréacteur instrumenté
- Figure 54. Schéma du pétrin bioréacteur instrumenté
- Figure 55. Profil d'élution des protéines de la farine BPMF
- Figure 56. Séparation de la phase chloroformique lipidique par centrifugation
- Figure 57. Schéma du fractionnement des lipides neutres par chromatographie sur couche mince (gel de silice).



## Liste des figures

---

- Figure 58. Schéma de principe et conditions expérimentales de la chromatographie échangeuses d'anions couplé au système FPLC
- Figure 59. Principe de détermination du volume de l'enceinte du sitoxygraphe – analyseur de gaz
- Figure 60. Evaluation du temps de réponse du système à vide par libération d'une quantité connue de CO<sub>2</sub> dans la cuve
- Figure 61. Vitesse d'apparition du CO<sub>2</sub> en fonction du temps mesuré dans l'enceinte du sitoxygraphe par l'analyseur de gaz
- Figure 62. Evolution de la teneur en CO<sub>2</sub> d'une pâte non levurée pendant 25 minutes de pétrissage au sitoxygraphe.
- Figure 63. Evolution du signal mesuré sur la voie CO<sub>2</sub> bt à partir de l'arrêt du moteur (ici après 10 minutes de pétrissage). t = 0 min correspond au temps de l'arrêt du bras
- Figure 64. Evolution de la teneur en O<sub>2</sub> au cours du pétrissage d'une pâte contenant 2,5 kg de farine, 1,5 L d'eau et 45 g de NaCl
- Figure 65. Evolution du signal mesuré sur la voie O<sub>2</sub> à partir de l'arrêt du moteur (ici après 10 minutes de pétrissage). t = 0 min correspond au temps de l'arrêt du bras
- Figure 66. Evolution du rapport entre la pente d'évolution du pourcentage de O<sub>2</sub> de la pâte au repos (k8) et la vitesse de diminution du pourcentage d'O<sub>2</sub> de la pâte pétrie au cours du pétrissage
- Figure 67. Principe de la détermination du volume de gaz libéré lors de la formation de la pâte au début du pétrissage
- Figure 68. Evolution de la mesure du pourcentage d'O<sub>2</sub> dans la cuve. Influence de la variation de pression sur la mesure
- Figure 69. Evolution de la mesure de pression au sein de l'atmosphère étanche du sitoxygraphe (3,2 kg de farine hydratée à 60 % d'eau avec 1,8 % de NaCl)
- Figure 70. Représentation de la variation du pourcentage d'O<sub>2</sub> en fonction de la variation de pression au sein de la cuve du sitoxygraphe à vide, moteur tournant à 30 rpm pour une teneur initiale de 20,9 % d'O<sub>2</sub> à la pression atmosphérique.
- Figure 71. Evolution du pourcentage d'oxygène (corrige ou non des variations de pression) dans l'enceinte du sitoxygraphe lors du pétrissage d'une farine BPMF (3,2 kg hydratée à 60 % d'eau et avec une teneur en NaCl de 1,8 % ajouté)
- Figure 72. Choix d'un modèle de type sigmoïde pour modéliser l'évolution de la consommation d'O<sub>2</sub> au sitoxygraphe
- Figure 73. Evolution des écarts au carré entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées déterminées par le modèle de Rodbard et par le polynôme de degré 4
- Figure 74. Evolution des écarts au carré entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées déterminées par la modélisation en deux parties (deux modèles de Rodbard) entre 0 et 10 minutes et entre 7,5 et 25 minutes
- Figure 75. Exemple d'évolution d'une courbe de couple Témoin (Corde Noire spéciale hydratée à 60 %) : données brutes (en gris), C<sub>max</sub> et C<sub>min</sub> (en rouge), en noir (C<sub>moyen</sub>)
- Figure 76. Exemple d'évolution du couple d'une pâte Témoin (Corde Noire spéciale hydratée à 60 %) pendant deux séquences d'acquisition rapide (6 s) alors que le bras mobile tourne à 52,5 rpm.
- Figure 77. Définition des paramètres (nomenclature et n° utilisé) étudiés sur les données de couple (exemple de courbe de couple moyen obtenue sur une pâte de Corde Noires spéciale)
- Figure 78. Evolution moyenne de la consommation d'oxygène d'une pâte témoin (2,5 kg de farine BPMF, 60 % d'eau, 1,8 % de NaCl)
-

## Liste des figures

- Figure 79. Evolution de la pression (données brutes) d'une pâte Témoin obtenue à partir de 2,5 kg de farine BPMF hydratée à 60 % et contenant 1,8 % de NaCl
- Figure 80. Evolution moyenne de la variation de pression au sein de la cuve lors du pétrissage d'une pâte témoin (2,5 kg de farine BPMF, 60 % d'eau, 1,8 % de NaCl) pendant 25 min (2 min de frasage à 30 rpm et 23 min de pétrissage à 52,5 rpm)
- Figure 81. Evolution moyenne du couple moyen (noire) et de l'épaisseur du couple (rose) au sein de la cuve lors du pétrissage d'une pâte Témoin (2,5 kg de farine CNS, 60 % d'eau, 1,8 % de NaCl) pendant 25 minutes (2 min de frasage à 30 rpm et 23 minutes de pétrissage à 52,5 rpm).
- Figure 82. Effet de la masse de pâte sur la consommation (A.) et sur les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (B.) au cours du pétrissage de 1,5 - 2 - 2,5 et 3 kg de farine BPMF avec le sitoxygraphe
- Figure 83. Effet de la masse de farine humide ajoutée dans le sitoxygraphe (quantité d'eau ajoutée constant = 60 %), quantité de NaCl constante = 1,8 %) sur la valeur du Cmin
- Figure 84. Evolution des consommations d'oxygène (A,C,E) et de leurs vitesses (B,D,F) par des pâtes de farines issues de variétés pures pendant leur pétrissage au sitoxygraphe
- Figure 85. Mise en évidence d'une décélération linéaire de la vitesse à partir de 16 minutes de pétrissage pour la farine CNS
- Figure 86. Evolution des consommations d'oxygène (A,C,E) et de leurs vitesses (B,D,F) des pâtes de farine issues de variétés pures pendant leur pétrissage au bioréacteur
- Figure 87. Correspondances des échelles de temps pour les vitesses les mieux corrélées entre les deux pétrins (sitoxygraphe et bioréacteur)
- Figure 88. Analyse en composante principale (ACP) sur les données oxygène (consommation totale d'O<sub>2</sub> à la fin du pétrissage et vitesse instantanée de consommation d'oxygène (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>)) issues du Bioréacteur.
- Figure 89. Analyse en composante principale (ACP) sur les données oxygène (consommation totale d'O<sub>2</sub> à la fin du pétrissage et vitesse instantanée de consommation d'oxygène (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>)) issues du Sitoxygraphe.
- Figure 90. Représentation des vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) en fonction de l'O<sub>2</sub> consommé dans la cuve du bioréacteur (A. - C. - E.) et du sitoxygraphe (B. - D. - F.)
- Figure 91. Activité lipoxygénasique extractible à partir des farines et des pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur
- Figure 92. Corrélation entre les activités LOX (nkat.g<sup>-1</sup> ms) extractibles des farines et des pâtes en fin de pétrissage au sitoxygraphe
- Figure 93. Corrélation entre les activités LOX (nkat.g<sup>-1</sup> ms) extractibles des farines et des pâtes en fin de pétrissage au bioréacteur
- Figure 94. Activités catalasiques extractibles à partir des farines et des pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur
- Figure 95. Activités peroxydasiques (POD) extractibles à partir des farines et des pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur
- Figure 96. Evolution du coefficient de corrélation de Pearson entre les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (bioréacteur) et les activités ou pertes d'activités de la POD et de la CAT
- Figure 97. Quantification des différentes fractions de lipides des farines
- Figure 98. Quantification des acides gras saturés et monoinsaturés (SMUFA) des fractions AGL et MAG des farines et des pâtes (bioréacteur et sitoxygraphe)
- Figure 99. Quantification des acides gras poly insaturés (PUFA) des fractions AGL et MAG des farines et des pâtes (bioréacteur et sitoxygraphe)

## Liste des figures

Figure 100. Corrélation entre la quantité d'acides gras poly insaturés oxydés des fractions AGL et MAG dans les pâtes bioréacteur et sitoxygraphe

Figure 101. Dosage des caroténoïdes dans les farines et dans les pâtes issues du sitoxygraphe et du bioréacteur

Figure 102. Corrélation entre la quantité de caroténoïdes oxydée au cours du pétrissage - comparaison du sitoxygraphe et du bioréacteur

Figure 103. Quantité totale de protéines extraites des farines des variétés pures de blé et des pâtes pétries au bioréacteur et au sitoxygraphe

Figure 104. Comparaison de la quantité relative de gluténines de haut poids moléculaires (HMW) par rapport aux gluténines de faibles poids moléculaires (LMW) entre les farines et les pâtes des variétés de blé pétries au bioréacteur et au sitoxygraphe (rapport F1/F2)

Figure 105. Comparaison de la quantité relative des gliadines (fractions F3 + F4) par rapport aux gluténines totales (F1 + F2) entre les farines et les pâtes des variétés de blé pétries au bioréacteur et au sitoxygraphe

Figure 106. Exemple des courbes de couple moyen obtenues au sitoxygraphe

Figure 107. Contribution des phénomènes oxydatifs aux variations des paramètres de consistance : synthèse des corrélations entre les données d'oxygène et les paramètres de couple mesurés au sitoxygraphe

Figure 108. Effet de l'ajout d'acide *L-Thréo* ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la courbe de consommation d'O<sub>2</sub>. les courbes moyenne  $\pm$  ET des 3 essais sont représentées en traits fins

Figure 109. Effet de l'ajout d'acide *L-Thréo* ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> dans la partie initiale du pétrissage.

Figure 110. Effet de l'ajout d'acide *L-Thréo* ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> dans la partie finale du pétrissage.

Figure 111. Effet de l'ajout d'acide *L-Thréo* ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> exprimée en fonction de l'oxygène consommé dans la pâte pendant le pétrissage

Figure 112. Effet de l'acide ascorbique (0,6 et 2,3  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la consommation d'O<sub>2</sub> au bioréacteur.

Figure 113. Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage

Figure 114. Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'évolution de l'épaisseur de la courbe de couple pendant le pétrissage

Figure 115. Effet de l'ajout de cystéine (0,06 et 0,23  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la courbe de consommation d'O<sub>2</sub>

Figure 116. Effet de l'ajout de cystéine (0,06 et 0,23  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> pendant le pétrissage

Figure 117. Effet de l'ajout de Cystéine (0,06 et 0,23  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> exprimée en fonction de l'oxygène consommé dans la pâte pendant le pétrissage

Figure 118. Effet de l'addition de deux doses de bromate de potassium sur la consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte pétrie au sitoxygraphe

Figure 119. Effet de l'addition de deux doses de bromate de potassium sur la consommation d'O<sub>2</sub> de la pâte pétrie au sitoxygraphe

Figure 120. Effet de l'addition de deux doses de bromate de potassium sur la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> exprimée en fonction de l'oxygène consommé de la pâte pétrie au sitoxygraphe

Figure 121. Effet de l'ajout de deux doses de bromate de potassium (0,87 et 2,6  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur l'évolution du couple pendant le pétrissage

## Liste des figures

- Figure 122. Effet de l'ajout de deux doses de bromate de potassium ( $0,87$  et  $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple pendant le pétrissage
- Figure 123. Effet de l'ajout de  $30 \text{ ppm}$  d'azodicarbonamide (ADA) sur l'évolution du couple pendant le pétrissage
- Figure 124. Effet de l'ajout d'ABTS ( $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage
- Figure 125. Effet de l'ajout d'ABTS ( $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage
- Figure 126. Courbes de consommation d'oxygène mesurée au sitoxygraphe pour des pâtes non levurées additionnées de glucose oxydase (GOX,  $5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ), de glucose (Glc,  $40 \text{ g}$ ) et de NaCl ( $1,8 \%$ ) pour des pâtes de  $4 \text{ kg}$  ( $55 \text{ g d'eau.100 g}^{-1} \text{ farine}$ )
- Figure 127. Cinétique de consommation d'oxygène mesurée au sitoxygraphe pour des pâtes non levurées additionnées de glucose oxydase (GOX,  $5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ), de glucose (Glc,  $40 \text{ g}$ ) et de NaCl ( $1,8 \%$ ) pour des pâtes de  $4 \text{ kg}$  ( $55 \text{ g d'eau.100 g}^{-1} \text{ farine}$ )
- Figure 128. Cinétique de consommation d'oxygène mesurée au sitoxygraphe et exprimée en fonction de la quantité d' $\text{O}_2$  consommée pour des pâtes additionnées de glucose oxydase (GOX,  $5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ), de glucose (Glc,  $40 \text{ g}$ ), et de NaCl ( $1,8 \%$ ) pour des pâtes de  $4 \text{ kg}$  ( $55 \text{ g d'eau.100 g}^{-1} \text{ farine}$ )
- Figure 129. Représentation de l'attribution de la vitesse de consommation à la GOX en fin de pétrissage Evolution de la différence entre la vitesse de consommation d' $\text{O}_2$  exprimée en  $\text{kat.g}^{-1} \text{ ms}$  avec ou sans Gox, pour des pâtes formées de farine et d'eau, de glucose ou non et de NaCl ou non
- Figure 130. Effet de l'ajout de Glucose oxydase (Gox,  $5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage (en présence de glucose (Glc) et de glucose et de NaCl (Glc + NaCl))
- Figure 131. Effet de l'ajout de Glucose oxydase (Gox,  $5 \text{ nkat.g}^{-1} \text{ ms}$ ) sur l'évolution du couple moyen pendant le pétrissage (en présence de glucose (Glc) et de glucose et de NaCl (Glc + NaCl))
- Figure 132. Evolution des consommations d'oxygène au bioréacteur pour des pâtes supplémentées en laccases (AT, K1, PC, TB, TSN) à activité constante de  $0,5 \mu\text{kat}$  vis-à-vis de l'AF  $2 \text{ mM}$
- Figure 133. Effet de la quantité d'activité ajoutée en cuve sur les consommations d' $\text{O}_2$  mesurée au Bioréacteur :  $0,5$  et  $2 \mu\text{kat}$  pour toutes les enzymes sauf pour K1 ( $0,25$  et  $0,5 \mu\text{kat}$ ), activité mesurée vis-à-vis de l'AF  $2 \text{ mM}$  à  $\text{pH} = 5,6$
- Figure 134. Profil d'éluion obtenu lors de l'étape de chromatographie d'échange d'ions
- Figure 135. Isoélectrofocalisation (IEF gradient de  $\text{pH}$   $3-10$ ) de la laccase PC
- Figure 136 : Electrophorèse SDS PAGE
- Figure 137. Effet de doses croissantes de chlorure de sodium ( $10$  à  $200 \text{ mM}$ ) sur l'activité de la laccase K1 mesurée vis-à-vis de l'ABTS par spectrophotométrie à  $\text{pH} = 5,6$  et à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Représentation de Lineweaver-Burke) en icône, graphique secondaire
- Figure 138. Mécanisme d'oxydation des phénols par la laccase (Brown, 1967)
- Figure 139. Mécanisme mis en jeu lors de l'oxydation par un système laccase en présence d'un médiateur (d'après Fabbrinni *et al.*, 2002)
- Figure 140. Vitesse de consommation d'oxygène (à  $\text{pH} = 4$  et à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) dans les mélanges AF-AS en présence de la laccase PC (trait plein : courbe modélisée)
- Figure 141. Evolution du pourcentage d'AF dans les milieux contenant de l'AF  $0,27 \text{ mM}$  (trait plein) ou AF  $0,16 \text{ mM}$  (trait pointillé) en présence d'AS ( $0,1 \text{ mM}$  ou  $0,058 \text{ mM}$ ) ou non
- Figure 142. Evolution du pourcentage d'AS dans les milieux contenant de l'AS  $0,058 \text{ mM}$  (trait pointillé) ou AS  $0,1 \text{ mM}$  (trait plein) en présence d'AF ( $0,16 \text{ mM}$  ou  $0,27 \text{ mM}$ ) ou non

## Liste des figures

Figure 143. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de la L-DOPA par polarographie (représentation de Lineweaver et Burke). Conditions : pH = 5,6 ; 30 °C

Figure 144. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de l'AF par polarographie (représentation de Lineweaver et Burke). Conditions d'expériences : pH = 5,6 ; 30 °C

Figure 145. Consommation d'O<sub>2</sub> mesurée par polarographie lors de l'oxydation d'AF (0,3 mM) et de L-DOPA (0,6 mM) seuls ou en mélanges (à pH = 5,6 à 30 °C) dans 1,4 mL de solution

Figure 146. Vitesse de consommation d'oxygène (à pH = 5,6 et à 30 °C) dans les mélanges AF-DOPA en présence de la laccase PC

Figure 147. Profils d'élution obtenus lors de l'oxydation par PC d'un mélange DOPA-AF mesurés à 275 nm (haut) et 320 nm (bas)

Figure 148. Spectres d'absorption de la L-DOPA et de l'AF ainsi que de leurs produits d'oxydation par la laccase PC

Figure 149. Evolution des substrats phénoliques dans le mélange DOPA (0,2 mM) - AF (0,33 mM) (à pH = 5,6 et à 30 °C) en présence de la laccase PC. A. DOPA (% par rapport à la quantité initiale), B. AF (% par rapport à la quantité initiale)

Figure 150. Détermination des constantes cinétiques de la laccase PC vis-à-vis de l'AS par polarographie (représentation de Lineweaver et Burke). Conditions d'expériences : pH = 5,6 ; 30 °C

Figure 151. Vitesse de consommation d'oxygène (à pH = 5,6 et à 30 °C) dans les mélanges AS-DOPA en présence de la laccase PC

Figure 152. Spectre d'absorption de l'ABTS (0,05 mM) oxydé par la laccase PC à t = 60 s (pH = 5,6 ; 30 °C). En gris, spectre de l'ABTS initial

Figure 153. Evolution de l'absorbance à 405 nm lors d'injections successives de 20 nmoles d'AF (t = 60, 100, 120 s) à une solution d'ABTS (0,05 mM) oxydée par la laccase PC à pH 5,6 à 30 °C

Figure 154. Evolution de l'absorbance à 405 nm lors d'injections successives de 28 nmoles de tyrosine (à t = 60, 100, 180 et 240 s) à une solution d'ABTS (0,05 mM) oxydée par la laccase PC à pH 5,6 à 30 °C

Figure 155. Spectre d'absorbance caractéristique obtenu lors de l'oxydation d'ABTS en présence de tyrosine après 60 min de réaction

Figure 156. Photographies des pains lors des essais de panification. Comparaison de l'effet de laccase PC avec des améliorants classiques

Figure 157. Effet de l'ajout de la laccase PC sur la consommation d'oxygène au sitoxygraphe pour des pâtes pétries dans les conditions variétales (2,5 kg de farine, 1,5 kg d'eau, 45 g de NaCl)

Figure 158. Effet de l'AF 1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms et du glycérol sur la consommation d'oxygène d'une farine CN04 pétrie au sitoxygraphe (2,5 kg farine, 1,5 L d'eau, 1,8 % de NaCl) pétrie pendant 25 min à 52,5 rpm (dont 2 min de frasage à 30 rpm)

Figure 159. Effet de l'ajout de laccase PC (6  $\text{nkat.g}^{-1}$  ms) en présence d'AF (1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte pétrie au sitoxygraphe

Figure 160. Effet du système médiateur d'oxydation composé de la laccase PC et d'ABTS (0,5  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ms) sur la consommation d'O<sub>2</sub> au cours du pétrissage

Figure 161. Effet du système ABTS/PC sur les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> exprimées en fonction de l'O<sub>2</sub> consommé dans la pâte

Figure 162. Comparaison des allures de courbes de couple moyen en présence ou en absence du système médiateur ABTS/PC

## *Liste des figures*

---

Figure 163. Effet du système ABTS/PC médiateur d'oxydation sur la consommation d'oxygène de pâtes pétries en présence ou en absence de levure (1 %)

Figure 164. Pourcentage de CO<sub>2</sub> produit lors du pétrissage de pâtes en présence de levure avec ou sans système médiateur d'oxydation et en absence de celle-ci

Figure 165. Fractions totales des protéines extraites des pâtes pétries en présence de levure (ou non), en présence de système médiateur ((ou non et en présence de glycérol ou non) d'oxydation et en absence de celle-ci

Figure 166. Rapport de fractions F1/F2 des protéines extraites des pâtes pétries en présence de levure (ou non), en présence de système médiateur ((ou non et en présence de glycérol ou non) d'oxydation et en absence de celle-ci

Figure 167. Rapport gliadines / gluténines ((F3+F4)/(F1+F2)) des protéines extraites des pâtes pétries en présence de levure (ou non), en présence de système médiateur ((ou non et en présence de glycérol ou non) d'oxydation et en absence de celle-ci

Figure 168. Détection du pic correspondant à l'élution d'ABTS dans les échantillons de pâte analysé par CLHP –UV

Figure 169. Quantification par HPLC – DAD de l'ABTS libre dans les extraits protéiques des pâtes. Témoin : réponse correspondant à une solution d'ABTS 10 µM injecté directement dans le système HPLC



---

## Liste des Tableaux

- Tableau 1. Durée des petite (40 rpm) et grande (80 rpm) vitesses utilisées selon le type de pétrissage (d'après Feillet, 2000)
- Tableau 2. Comparaison des caractéristiques de fonctionnement des pétrins français les plus répandus (d'après Roussel et Chiron, 2002) avec les caractéristiques du sitoxygraphe
- Tableau 3. Comparaison des effets de différents pétrissage sur les pâtes avec ceux du sitoxygraphe
- Tableau 4. Classification des protéines selon leur solubilité (d'après Osborne, 1907)
- Tableau 5. Ensemble des systèmes impliqués dans les réactions d'oxydoréductions des pâtes (Potus *et al.*, 1999)
- Tableau 6. Principaux améliorants utilisés en panification et leurs effets
- Tableau 7. Influence de l'origine de la laccase sur la valeur du Km vis-à-vis de plusieurs substrats.
- Tableau 8. Influence de l'origine de l'enzyme sur le pH optimum en fonction du substrat
- Tableau 9. Caractéristiques biochimiques des farines (% mh : en pourcentage de la matière humide ; % ms : en pourcentage de la matière sèche)
- Tableau 10. Caractéristiques alvéographiques et farinographiques des farines étudiées
- Tableau 11. Résultats obtenus pour les farines étudiées lors du test de panification normalisé BIPEA. (nd : non déterminé)
- Tableau 12. Substrats redox utilisés
- Tableau 13. Réactifs et produits utilisés
- Tableau 14. Caractéristiques des laccase étudiées fournies par la société Puratos<sup>®</sup>, nc : non connu
- Tableau 15. Correspondance entre les fractions protéiques séparées par gel filtration et les masses moléculaires
- Tableau 16. Longueur d'onde spécifique et coefficient d'extinction molaire des substrats redox utilisés pour mesurer l'activité laccasique au spectrophotomètre à pH 4 et 5,6
- Tableau 17 Conditions chromatographiques pour l'analyse de l'oxydation des mélanges de composés phénoliques oxydés par PC
- Tableau 18. Matrice d'expériences en valeurs centrées réduites des facteurs étudiés. X1, Vitesse de rotation du bras ; X2, Hydratation de la pâte ; X3, Température initiale des ingrédients
- Tableau 19. Domaine expérimental du plan d'expériences utilisé
- Tableau 20. Détermination des coefficients du modèle de réponse du signal CO<sub>2</sub> bt, après arrêt du moteur
- Tableau 21. Détermination des paramètres du modèle prévoyant la réponse du capteur à O<sub>2</sub> après arrêt du bras du pétrin. nd : non déterminé
- Tableau 22. Pente de diminution du pourcentage d'O<sub>2</sub>
- Tableau 23. Paramètres extraits des courbes de couple Témoin (moyen et épaisseur) d'une pâte formée à partir de Corde Noire spéciale
- Tableau 24. Importance relative des facteurs (valeurs des coefficients exprimées en pourcentage de la moyenne) étudiés dans le plan d'expérience sur la mesure de consommation d'O<sub>2</sub> d'une pâte (seul les coefficients significatifs avec un intervalle de confiance de 95 % sont représenté)
- Tableau 25 Représentation du Volume de la phase gazeuse ( $V_{\text{og}}$ ) et de la quantité d'O<sub>2</sub> disponible au sein de la cuve en fonction de la masse de farine et/ou de la réduction du volume mort par l'ajout de la pièce plastique
- Tableau 26. Effet de la masse de farine sur les maxima et minima extraits de la courbe de couple moyen
- Tableau 27. Effet de la masse de farine sur les paramètres significatifs extraits de la courbe de couple moyen (temps d'apparition des pics, affaiblissement, raffermissement et stabilité)

## Liste des tableaux

- Tableau 28. Correspondance entre le temps d'apparition de la zone linéaire de décroissance de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub>, la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> à laquelle apparaît cette zone et sa décélération pour chaque variété de farine étudiée
- Tableau 29. Corrélations de Pearson entre les vitesses de consommation et l'oxygène consommé mesurés sur les deux pétrins, le sitoxygraphe ( $V_iO_{2S}$  et  $O_{2TOTALS}$ ) et le bioréacteur ( $V_iO_{2B}$  et  $O_{2TOTALB}$ )
- Tableau 30. Vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> maximale et durée (Stab) pendant laquelle la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> reste supérieure à 80 % de la vitesse maximale pour les 13 variétés au bioréacteur et au sitoxygraphe
- Tableau 31. Vitesses maximales de consommation d'O<sub>2</sub> (en rouge) et leur diminution (en %, en noir) en fonction de la quantité d'O<sub>2</sub> consommée
- Tableau 32. Variation de l'activité LOX (nkat.g<sup>-1</sup> ms) des farines pour les années 1999, 2002, 2003, 2005
- Tableau 33. Tableau présentant les coefficients de corrélation de Pearson déterminés sur les activités lipoxygénasique des farines et des pâtes issues des deux pétrins
- Tableau 34. Variation de l'activité CAT (μkat.g<sup>-1</sup> ms) des farines pour les années 1999, 2002 et 2005
- Tableau 35. Corrélation de Pearson entre l'activité Catalasique (CAT) des farines, des pâtes et la perte en activité au cours du pétrissage des variétés avec le sitoxygraphe et le bioréacteur
- Tableau 36. Corrélation de Pearson entre les teneurs en acides gras polyinsaturés (PUFA) oxydables et oxydés des fractions AGL, MAG et des deux réunies avec les données O<sub>2</sub> ( $O_{2TOTAL}$  et  $V_iO_2$ ) issues du sitoxygraphe
- Tableau 37. Corrélation de Pearson entre les teneurs en acides gras polyinsaturés (PUFA) oxydables et oxydés des fractions AGL, MAG et des deux réunies avec les données O<sub>2</sub> ( $O_{2TOTAL}$  et  $V_iO_2$ ) issues du bioréacteur
- Tableau 38. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen de la première phase de pétrissage au sitoxygraphe (24 observations complètes)
- Tableau 39. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen des deux phases de pétrissage (excepté  $St2_{moy}$ ) au sitoxygraphe (18 observations complètes)
- Tableau 40. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple définis à partir de la courbe d'épaisseur
- Tableau 41. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple définis à partir de la courbe d'épaisseur et de la courbe de couple moyen
- Tableau 42. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents et les données oxygène issues du sitoxygraphe (S)
- Tableau 43. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents avec les données oxygène issues du bioréacteur (B)
- Tableau 44. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents et les teneurs en PUFA endogènes de la farine
- Tableau 45. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen les plus pertinents avec les paramètres du consistographe de chopin (54 % d'eau distillée pour 100 g de farine)
- Tableau 46. Corrélation de Pearson entre les paramètres de couple moyen de la première phase de pétrissage au sitoxygraphe avec les paramètres déterminés au farinographe (22 observations complètes) et à l'alvéographe (22 observations complètes)
- Tableau 47. Effets de l'ajout de l'AA sur les paramètres extraits de la courbe  $V_{O_2} = f(O_2)$  (les pâtes supplémentées en acide ascorbique sont répétées deux fois)
- Tableau 48. Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'évolution du couple pendant le pétrissage.
- Tableau 49. Effets de l'ajout de cystéine sur les paramètres extraits de la courbe  $V_{O_2} = f(O_2)$
- Tableau 50. Effets de l'ajout de 2 doses de bromate de potassium sur les paramètres extraits de la courbe  $V_{O_2} = f(O_2)$



## Liste des tableaux

- Tableau 51. Effet de l'ajout de bromate de potassium sur les paramètres extraits de la courbe de couple moyen
- Tableau 52. Effet de l'ajout de bromate de potassium sur les paramètres extraits de la courbe d'épaisseur de la courbe
- Tableau 53. Synthèse de résultats : effet de l'ajout de Glucose oxydase (GOX, 5 nkat.g<sup>-1</sup> ms) sur les paramètres extraits de la courbe d'épaisseur de couple pendant le pétrissage (en présence de glucose (Glc) et de glucose et de NaCl (Glc + NaCl))
- Tableau 54. Constantes cinétiques (Km en mM, et Vm en nkat.mL<sup>-1</sup>) déterminés pour chacune des enzymes à pH = 4 et à 30 °C pour différents substrats redox et calcul des efficacités catalytiques (Eff = Vm / Km exprimée en pourcent de l'efficacité de PC vis-à-vis de l'AF)
- Tableau 55. Constantes cinétiques (Km en mM, et Vm en nkat.mL<sup>-1</sup>) déterminés pour chacune des enzymes à pH = 5,6 et à 30 °C pour différents substrats redox et calcul des efficacités catalytiques (Eff = Vm / Km exprimée en pourcent de l'efficacité de PC vis-à-vis de l'AF). Entre crochets, efficacité en pourcent de l'efficacité de PC vis-à-vis d'AF à pH = 4
- Tableau 56. Effet de l'ajout de NaCl (0,2 M) sur l'activité des laccases (nkat.mL<sup>-1</sup>) testées à pH = 5,6 (tampon acétate 0,1 M), 30 °C, mesurée par polarographie vis-à-vis de deux concentrations en AF
- Tableau 57. Bilan des étapes de purification de 2 mL de l'extrait brut (EB) de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* donné pour 1 mL d'extrait
- Tableau 58. Effet de l'exposition de la laccase PC aux ions chlorures
- Tableau 59. Constantes cinétiques du nouvel échantillon de PC vis-à-vis de l'AF et de l'AS déterminé par polarographie à pH = 4 et à 30 °C
- Tableau 60. Quantités d'O<sub>2</sub> consommées (nmoles) par la laccase PC dans les mélanges AF-AS à différentes concentrations en fonction du temps (pH = 4 à 30 °C)
- Tableau 61. Valeurs moyennes (et écart type) des stœchiométries phénols disparus/oxygène consommé pour l'ensemble des extraits (8 milieux × 3 durées = 24 valeurs), les extraits du milieu « mélange » (4 milieux × 3 durées = 12 valeurs) et les extraits des milieux « purs » (4 milieu × 3 durées = 12 valeurs)
- Tableau 62. Comparaison de l'ajout de laccase PC sur le pourcentage d'augmentation du volume spécifique de pains l'effet d'améliorants classiques
- Tableau 63. Effet de la dose de laccase PC sur les paramètres (W, G, P) déterminés lors du test à l'alvéographe
- Tableau 64. Effet de la dose de laccase sur les paramètres de couple moyen définis au sitoxygraphe

## 7 ANNEXES

## 7.1 Annexe 1 :

Tableau 1-Annexe 1 Expression des vitesses instantanées de consommation d'O<sub>2</sub> (en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms.min}^{-1}$ ) pour les deux pétrins (sitoxygraphe t bioréacteur) à intervalle d'O<sub>2</sub> consommé donné (en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ )

| O <sub>2</sub> consommé | Sitoxygraphe |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                         | 0,25         | 0,50 | 1,00 | 1,50 | 2,00 | 2,50 | 3,00 | 3,50 | 4,00 | 4,50 | 5,00 |
| CN04                    | 0,45         | 0,42 | 0,37 | 0,31 | 0,25 | 0,19 | 0,13 | 0,08 |      |      |      |
| CNS                     | 0,52         | 0,51 | 0,50 | 0,49 | 0,46 | 0,43 | 0,39 | 0,34 | 0,28 | 0,20 | 0,11 |
| BPMF                    | 0,37         | 0,36 | 0,33 | 0,29 | 0,25 | 0,21 | 0,16 | 0,11 | 0,10 |      |      |
| AP                      | 0,40         | 0,38 | 0,33 | 0,28 | 0,23 | 0,18 | 0,13 | 0,09 |      |      |      |
| AU                      | 0,43         | 0,41 | 0,38 | 0,34 | 0,30 | 0,26 | 0,22 | 0,17 | 0,13 |      |      |
| CA                      | 0,39         | 0,38 | 0,35 | 0,31 | 0,28 | 0,23 | 0,19 | 0,14 | 0,11 |      |      |
| CH                      | 0,33         | 0,31 | 0,27 | 0,23 | 0,18 | 0,12 | 0,07 |      |      |      |      |
| ME                      | 0,45         | 0,43 | 0,38 | 0,34 | 0,28 | 0,23 | 0,16 | 0,09 |      |      |      |
| NI                      | 0,26         | 0,26 | 0,25 | 0,23 | 0,20 | 0,12 | 0,08 |      |      |      |      |
| OR                      | 0,29         | 0,27 | 0,24 | 0,20 | 0,16 | 0,11 | 0,08 |      |      |      |      |
| QB                      | 0,45         | 0,43 | 0,40 | 0,37 | 0,33 | 0,29 | 0,24 | 0,19 | 0,14 | 0,11 |      |
| S1                      | 0,45         | 0,43 | 0,40 | 0,35 | 0,31 | 0,26 | 0,21 | 0,15 | 0,10 |      |      |
| S2                      | 0,35         | 0,33 | 0,29 | 0,25 | 0,20 | 0,14 | 0,08 | 0,08 |      |      |      |
| O <sub>2</sub> consommé | Bioréacteur  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|                         | 0,25         | 0,50 | 1,00 | 1,50 | 2,00 | 2,50 | 3,00 | 3,50 | 4,00 | 4,50 | 5,00 |
| CN04                    | 0,23         | 0,22 | 0,21 | 0,19 | 0,17 | 0,15 | 0,13 | 0,10 |      |      |      |
| CNS                     | 0,19         | 0,19 | 0,19 | 0,19 | 0,18 | 0,17 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | 0,09 | 0,05 |
| BPMF                    | 0,19         | 0,18 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,06 | 0,05 |      |      |
| AP                      | 0,19         | 0,18 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,06 |      |      |      |
| AU                      | 0,15         | 0,15 | 0,15 | 0,14 | 0,12 | 0,11 | 0,08 | 0,06 | 0,03 |      |      |
| CA                      | 0,20         | 0,20 | 0,18 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,05 |      |      |
| CH                      | 0,13         | 0,12 | 0,11 | 0,10 | 0,08 | 0,06 | 0,03 |      |      |      |      |
| ME                      | 0,22         | 0,21 | 0,19 | 0,17 | 0,14 | 0,12 | 0,09 | 0,06 |      |      |      |
| NI                      | 0,18         | 0,17 | 0,15 | 0,13 | 0,11 | 0,09 | 0,07 |      |      |      |      |
| OR                      | 0,18         | 0,17 | 0,15 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,06 |      |      |      |      |
| QB                      | 0,20         | 0,19 | 0,18 | 0,17 | 0,15 | 0,13 | 0,11 | 0,09 | 0,06 | 0,04 |      |
| S1                      | 0,13         | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,10 | 0,09 | 0,07 | 0,05 | 0,03 |      |      |
| S2                      | 0,17         | 0,17 | 0,15 | 0,13 | 0,11 | 0,09 | 0,06 | 0,04 |      |      |      |

## 7.2 Annexe 2 :

Tableau 1-Annexe 2 Coefficients des corrélations de Pearson entre les fractions *a priori* non oxydables et les données O<sub>2</sub> mesurées au sitoxygraphe (O<sub>2</sub> total et V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>)

|                                | TAG <sub>PUFA</sub> | DAG1,3 <sub>PUFA</sub> | DAG1,2 <sub>PUFA</sub> | LPT <sub>PUFA</sub> |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| V <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | -0,11               | <b>0,60</b>            | <b>0,58</b>            | 0,21                |
| V <sub>6</sub> O <sub>2</sub>  | -0,06               | <b>0,65</b>            | <b>0,50</b>            | 0,08                |
| V <sub>8</sub> O <sub>2</sub>  | -0,03               | <b>0,64</b>            | <b>0,42</b>            | -0,02               |
| V <sub>10</sub> O <sub>2</sub> | -0,03               | <b>0,59</b>            | 0,36                   | -0,07               |
| V <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | -0,05               | <b>0,50</b>            | 0,32                   | -0,09               |
| V <sub>14</sub> O <sub>2</sub> | -0,11               | 0,32                   | 0,29                   | -0,08               |
| V <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | -0,22               | -0,01                  | 0,25                   | 0,00                |
| V <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | -0,29               | -0,35                  | 0,19                   | 0,11                |
| V <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | -0,30               | <b>-0,48</b>           | 0,20                   | 0,18                |
| V <sub>22</sub> O <sub>2</sub> | -0,25               | -0,29                  | 0,32                   | 0,13                |
| V <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | -0,02               | 0,33                   | 0,34                   | -0,09               |
| O <sub>2</sub> TOTAL           | -0,11               | <b>0,45</b>            | <b>0,44</b>            | 0,02                |

Tableau 2 Annexe 2 Coefficients des corrélations de Pearson entre les fractions *a priori* non oxydables et les données O<sub>2</sub> mesurées au bioréacteur (O<sub>2</sub> total et V<sub>i</sub>O<sub>2</sub>)

|                                | TAG <sub>PUFA</sub> | DAG1,3 <sub>PUFA</sub> | DAG1,2 <sub>PUFA</sub> | LPT <sub>PUFA</sub> |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| V <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | -0,16               | <b>0,42</b>            | -0,12                  | 0,13                |
| V <sub>8</sub> O <sub>2</sub>  | -0,14               | <b>0,62</b>            | 0,06                   | 0,14                |
| V <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | -0,10               | <b>0,73</b>            | 0,21                   | 0,12                |
| V <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | -0,09               | <b>0,75</b>            | 0,32                   | 0,10                |
| V <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | -0,08               | <b>0,73</b>            | 0,37                   | 0,07                |
| V <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | -0,10               | <b>0,67</b>            | <b>0,39</b>            | 0,04                |
| V <sub>28</sub> O <sub>2</sub> | -0,15               | <b>0,60</b>            | <b>0,39</b>            | 0,00                |
| V <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | -0,24               | <b>0,48</b>            | 0,36                   | -0,06               |
| V <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | <b>-0,40</b>        | 0,26                   | 0,30                   | -0,14               |
| V <sub>40</sub> O <sub>2</sub> | <b>-0,57</b>        | -0,06                  | 0,16                   | -0,21               |
| V <sub>44</sub> O <sub>2</sub> | <b>-0,70</b>        | -0,34                  | 0,06                   | -0,22               |
| V <sub>48</sub> O <sub>2</sub> | <b>-0,73</b>        | -0,37                  | 0,16                   | -0,17               |
| V <sub>52</sub> O <sub>2</sub> | <b>-0,53</b>        | -0,07                  | <b>0,44</b>            | -0,03               |
| O <sub>2</sub> TOTAL           | -0,28               | <b>0,67</b>            | 0,29                   | 0,06                |

## 7.3 Annexe 3 :

Tableau 1-Annexe 3 Corrélations entre l'état d'agrégation des protéines des farines et des pâtes pétrées au sitoxygraphe et les données oxygènes mesurées au sitoxygraphe.

|                   | V <sub>2,5</sub> O <sub>2S</sub>                                    | V <sub>4</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>6</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>8</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>10</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>12</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>14</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>16</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>18</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>20</sub> O <sub>2S</sub> | V <sub>22</sub> O <sub>2S</sub> | O <sub>2</sub> <sup>total</sup> <sub>S</sub> |             |
|-------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|-------------|
| farine            | F <sub>T</sub>  | 0,34                           | <b>0,44</b>                    | <b>0,52</b>                    | <b>0,55</b>                     | <b>0,564</b>                    | <b>0,560</b>                    | <b>0,52</b>                     | 0,38                            | 0,16                            | 0,04                            | 0,17   | <b>0,59</b> |
|                   | F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub>                                      | 0,25                           | 0,34                           | <b>0,40</b>                    | <b>0,42</b>                     | <b>0,41</b>                     | 0,38                            | 0,30                            | 0,12                            | -0,10                           | -0,21                           | -0,13  | 0,38        |
|                   | F <sub>3</sub> +F <sub>4</sub>                                      | 0,34                           | <b>0,45</b>                    | <b>0,54</b>                    | <b>0,58</b>                     | <b>0,60</b>                     | <b>0,61</b>                     | <b>0,59</b>                     | <b>0,48</b>                     | 0,26                            | 0,16                            | 0,32   | <b>0,64</b> |
|                   | F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>                                      | <b>0,39</b>                    | 0,36                           | 0,31                           | 0,26                            | 0,23                            | 0,22                            | 0,22                            | 0,22                            | 0,19                            | 0,16                            | 0,16   | 0,27        |
|                   | (F <sub>3</sub> +F <sub>4</sub> )/(F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub> ) | 0,13                           | 0,16                           | 0,20                           | 0,23                            | 0,26                            | 0,32                            | <b>0,41</b>                     | <b>0,51</b>                     | <b>0,53</b>                     | <b>0,54</b>                     | <b>0,64</b>                                  | 0,36        |
|                   | F <sub>1</sub>  | 0,37                           | <b>0,43</b>                    | <b>0,462</b>                   | <b>0,460</b>                    | <b>0,44</b>                     | <b>0,42</b>                     | 0,35                            | 0,20                            | 0,00                            | -0,10                           | -0,03  | <b>0,44</b> |
|                   | F <sub>2</sub>  | 0,09                           | 0,19                           | 0,27                           | 0,30                            | 0,31                            | 0,28                            | 0,19                            | 0,02                            | -0,19                           | -0,29                           | -0,20  | 0,26        |
|                   | F <sub>3</sub>  | 0,34                           | <b>0,40</b>                    | <b>0,424</b>                   | <b>0,419</b>                    | <b>0,40</b>                     | 0,36                            | 0,29                            | 0,13                            | -0,05                           | -0,14                           | -0,04  | 0,39        |
|                   | F <sub>4</sub>  | 0,29                           | <b>0,41</b>                    | <b>0,50</b>                    | <b>0,56</b>                     | <b>0,59</b>                     | <b>0,610</b>                    | <b>0,609</b>                    | <b>0,52</b>                     | 0,33                            | 0,23                            | 0,39   | <b>0,64</b> |
|                   | F <sub>5</sub>  | 0,25                           | 0,26                           | 0,26                           | 0,25                            | 0,27                            | 0,29                            | 0,33                            | 0,38                            | 0,34                            | 0,29                            | 0,30   | 0,34        |
| pâte sitoxygraphe | F <sub>T</sub>  | 0,13                           | 0,18                           | 0,21                           | 0,23                            | 0,23                            | 0,23                            | 0,21                            | 0,16                            | 0,06                            | 0,01                            | 0,06   | 0,24        |
|                   | F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub>                                      | 0,13                           | 0,17                           | 0,20                           | 0,21                            | 0,21                            | 0,20                            | 0,17                            | 0,10                            | -0,01                           | -0,07                           | -0,03  | 0,20        |
|                   | F <sub>3</sub> +F <sub>4</sub>                                      | 0,14                           | 0,20                           | 0,23                           | 0,25                            | 0,25                            | 0,24                            | 0,21                            | 0,13                            | 0,02                            | -0,03                           | 0,05   | 0,26        |
|                   | F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>                                      | 0,24                           | 0,27                           | 0,27                           | 0,27                            | 0,26                            | 0,26                            | 0,25                            | 0,23                            | 0,15                            | 0,10                            | 0,15   | 0,30        |
|                   | (F <sub>3</sub> +F <sub>4</sub> )/(F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub> ) | 0,04                           | 0,06                           | 0,07                           | 0,08                            | 0,09                            | 0,10                            | 0,11                            | 0,12                            | 0,12                            | 0,17                            | 0,28   | 0,17        |
|                   | F <sub>1</sub>  | 0,20                           | 0,25                           | 0,28                           | 0,29                            | 0,29                            | 0,28                            | 0,25                            | 0,17                            | 0,05                            | -0,02                           | 0,03   | 0,29        |
|                   | F <sub>2</sub>  | 0,04                           | 0,08                           | 0,11                           | 0,12                            | 0,12                            | 0,11                            | 0,08                            | 0,02                            | -0,06                           | -0,10                           | -0,08  | 0,09        |
|                   | F <sub>3</sub>  | 0,18                           | 0,23                           | 0,24                           | 0,22                            | 0,18                            | 0,11                            | -0,03                           | -0,24                           | <b>-0,43</b>                    | <b>-0,49</b>                    | <b>-0,41</b>                                 | 0,13        |
|                   | F <sub>4</sub>  | 0,12                           | 0,17                           | 0,21                           | 0,23                            | 0,24                            | 0,25                            | 0,25                            | 0,22                            | 0,13                            | 0,10                            | 0,17   | 0,26        |
|                   | F <sub>5</sub>  | 0,03                           | 0,06                           | 0,09                           | 0,12                            | 0,16                            | 0,21                            | 0,28                            | 0,37                            | 0,37                            | 0,34                            | 0,33   | 0,18        |
| pâte bioréacteur  | F <sub>T</sub>  | 0,33                           | 0,38                           | <b>0,41</b>                    | <b>0,41</b>                     | <b>0,39</b>                     | 0,38                            | 0,34                            | 0,24                            | 0,09                            | 0,00                            | 0,07   | <b>0,40</b> |
|                   | F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub>                                      | 0,17                           | 0,26                           | 0,33                           | 0,37                            | <b>0,40</b>                     | <b>0,43</b>                     | <b>0,45</b>                     | <b>0,42</b>                     | 0,30                            | 0,25                            | 0,36   | <b>0,44</b> |
|                   | F <sub>3</sub> +F <sub>4</sub>                                      | 0,20                           | 0,27                           | 0,33                           | 0,35                            | 0,36                            | 0,36                            | 0,34                            | 0,26                            | 0,12                            | 0,05                            | 0,14   | 0,36        |
|                   | F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>                                      | 0,18                           | 0,27                           | 0,34                           | 0,37                            | <b>0,39</b>                     | <b>0,40</b>                     | 0,39                            | 0,31                            | 0,17                            | 0,09                            | 0,20   | 0,37        |
|                   | (F <sub>3</sub> +F <sub>4</sub> )/(F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub> ) | -0,11                          | -0,12                          | -0,11                          | -0,09                           | -0,06                           | -0,02                           | 0,07                            | 0,21                            | 0,31                            | 0,39                            | <b>0,42</b>                                  | 0,01        |
|                   | F <sub>1</sub>  | 0,22                           | 0,30                           | 0,36                           | 0,38                            | <b>0,39</b>                     | <b>0,40</b>                     | 0,37                            | 0,28                            | 0,13                            | 0,05                            | 0,16   | <b>0,39</b> |
|                   | F <sub>2</sub>  | 0,17                           | 0,24                           | 0,29                           | 0,31                            | 0,31                            | 0,32                            | 0,30                            | 0,23                            | 0,11                            | 0,04                            | 0,12   | 0,32        |
|                   | F <sub>3</sub>  | 0,15                           | 0,21                           | 0,26                           | 0,29                            | 0,29                            | 0,30                            | 0,28                            | 0,21                            | 0,10                            | 0,05                            | 0,14   | 0,30        |
|                   | F <sub>4</sub>  | 0,17                           | 0,26                           | 0,34                           | 0,38                            | <b>0,41</b>                     | <b>0,45</b>                     | <b>0,47</b>                     | <b>0,45</b>                     | 0,34                            | 0,28                            | <b>0,40</b>                                  | <b>0,46</b> |
|                   | F <sub>5</sub>  | 0,08                           | 0,12                           | 0,18                           | 0,22                            | 0,26                            | 0,32                            | <b>0,39</b>                     | <b>0,46</b>                     | <b>0,44</b>                     | <b>0,39</b>                     | <b>0,43</b>                                  | 0,32        |

## 7.4 Annexe 4 :

Tableau 1 Annexe 4 valeurs moyennes des paramètres pour chaque farine de l'étude variétale 2005 (entre parenthèses, coefficient de variation, CV en %)

|                     | CNS            | ME            | AU             | CA            | CH             | OR             | AP             | S1             | QB            | NI             | S2             | BPMF           | moyenne | ET   | CV (%) |
|---------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------|------|--------|
| CM1 <sub>moy</sub>  | 63,9<br>(1,2)  | 68,6<br>(0,1) | 63,9<br>(1,2)  | 56,0<br>(3,0) | 49,2<br>(0,2)  | 57,9<br>(2,4)  | 61,5<br>(6,3)  | 54,3<br>(1,1)  | 61,8<br>(0,0) | 63,6<br>(0,6)  | 60,6<br>(7,1)  | 56,9<br>(2,1)  | 59,9    | 5,3  | 8,9    |
| tM1 <sub>moy</sub>  | 2,5<br>(3,7)   | 2,5<br>(3,6)  | 2,4<br>(0,9)   | 2,5<br>(0,5)  | 2,4<br>(0,7)   | 2,5<br>(4,0)   | 2,5<br>(7,6)   | 2,4<br>(0,8)   | 2,4<br>(0,0)  | 2,4<br>(0,4)   | 2,5<br>(5,0)   | 2,5<br>(4,3)   | 2,5     | 0,07 | 2,9    |
| St1 <sub>moy</sub>  | 0,5<br>(20,7)  | 1,4<br>(21,0) | 0,7<br>(26,5)  | 1,0<br>(36,8) | 1,6<br>(55,6)  | 0,9<br>(14,8)  | 0,9<br>(7,5)   | 0,8<br>(32,0)  | 1,3<br>(0,0)  | 1,9<br>(39,2)  | 1,4<br>(1,4)   | 1,2<br>(19,3)  | 1,1     | 0,48 | 42,5   |
| C1m <sub>moy</sub>  | 56,4<br>(1,3)  | 62,5<br>(0,1) | 55,8<br>(1,4)  | 44,0<br>(2,1) | 45,2<br>(1,2)  | 52,8<br>(2,7)  | 54,5<br>(3,2)  | 45,2<br>(1,8)  | 54,4<br>(0,0) | 59,2<br>(1,7)  | 54,9<br>(6,2)  | 50,0<br>(0,9)  | 52,9    | 6    | 10,8   |
| tm1 <sub>moy</sub>  | 5,5<br>(23,8)  | 7,1<br>(0,8)  | 5,5<br>(14,0)  | 24,1<br>(0,2) | 9,6<br>(11,8)  | 6,6<br>(10,2)  | 6,4<br>(16,4)  | 15,8<br>(15,7) | 22,3<br>(0,0) | 6,3<br>(24,4)  | 6,5<br>(16,9)  | 10,2<br>(5,7)  | 10,5    | 6,52 | 62,1   |
| Af1 <sub>moy</sub>  | 7,6<br>(9,7)   | 6,2<br>(0,4)  | 8,1<br>(0,6)   | 11,9<br>(6,1) | 4,0<br>(11,4)  | 5,1<br>(0,0)   | 6,9<br>(52,3)  | 9,1<br>(2,2)   | 7,4<br>(0,0)  | 4,5<br>(14,4)  | 5,7<br>(15,3)  | 6,9<br>(12,0)  | 6,9     | 2,28 | 32,9   |
| tA1 <sub>moy</sub>  | 3,1<br>(45,5)  | 4,6<br>(3,2)  | 3,1<br>(25,7)  | 21,7<br>(0,1) | 7,2<br>(16,1)  | 4,1<br>(14,0)  | 4,0<br>(24,4)  | 13,4<br>(18,5) | 19,9<br>(0,0) | 3,8<br>(40,0)  | 4,0<br>(24,5)  | 7,7<br>(8,2)   | 8,0     | 6,53 | 81,3   |
| CM2 <sub>moy</sub>  | 63,5<br>(0,4)  | 64,1<br>(1,0) | 59,9<br>(1,1)  | nd<br>nd      | 49,1<br>(0,6)  | 56,2<br>(1,8)  | 56,8<br>(4,6)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 60,7<br>(1,2)  | 57,4<br>(4,7)  | 52,2<br>(1,3)  | 57,8    | 4,9  | 8,5    |
| tM2 <sub>moy</sub>  | 20,3<br>(8,1)  | 10,0<br>(7,8) | 14,2<br>(24,9) | nd<br>nd      | 23,1<br>(4,9)  | 15,7<br>(6,3)  | 13,8<br>(2,1)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 10,9<br>(26,1) | 14,4<br>(15,2) | 14,1<br>(3,1)  | 15,2    | 4,27 | 28,2   |
| St2 <sub>moy</sub>  | 7,1<br>(16,6)  | nd<br>nd      | 6,1<br>(44,4)  | nd<br>nd      | 8,9<br>(6,0)   | 6,4<br>(7,6)   | 6,8<br>(8,9)   | nd<br>nd       | nd<br>nd      | nd<br>nd       | 18,3<br>(11,1) | nd<br>nd       | 8,9     | 4,60 | 51,5   |
| St3 <sub>moy</sub>  | nd<br>nd       | 13,8<br>(5,0) | 14,1<br>(15,2) | nd<br>nd      | nd<br>nd       | nd<br>nd       | 15,4<br>(4,5)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | nd<br>nd       | nd<br>nd       | nd<br>nd       | 14,4    | 1,31 | 9,0    |
| Raf <sub>moy</sub>  | 7,1<br>(6,3)   | 1,6<br>(35,4) | 4,1<br>(3,6)   | nd<br>nd      | 3,9<br>(7,0)   | 3,4<br>(12,1)  | 2,2<br>(39,2)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 1,5<br>(20,3)  | 2,5<br>(28,2)  | 2,2<br>(9,3)   | 3,2     | 1,74 | 54,8   |
| tRa <sub>moy</sub>  | 14,8<br>(2,2)  | 2,9<br>(29,1) | 8,6<br>(49,8)  | nd<br>nd      | 13,5<br>(0,0)  | 9,1<br>(18,2)  | 7,4<br>(10,3)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 4,6<br>(94,9)  | 7,9<br>(13,9)  | 3,9<br>(3,8)   | 8,1     | 4,26 | 52,7   |
| Cfin <sub>moy</sub> | 61,0<br>(0,6)  | 57,3<br>(0,3) | 56,2<br>(0,4)  | nd<br>nd      | 48,2<br>(0,1)  | 54,1<br>(0,6)  | 54,4<br>(4,0)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 56,4<br>(3,3)  | 53,0<br>(0,0)  | 50,3<br>(0,5)  | 54,5    | 3,8  | 6,9    |
| Af2 <sub>moy</sub>  | 2,5<br>(3,9)   | 6,8<br>(6,6)  | 3,8<br>(23,3)  | nd<br>nd      | 0,9<br>(26,1)  | 2,1<br>(32,2)  | 2,4<br>(16,9)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 4,2<br>(60,8)  | 4,4<br>(60,9)  | 1,9<br>(21,4)  | 3,2     | 1,97 | 61,0   |
| CM1 <sub>ep</sub>   | 58,2<br>(6,7)  | 65,8<br>(0,5) | 56,3<br>(4,1)  | 43,9<br>(2,6) | 40,4<br>(2,1)  | 49,2<br>(1,1)  | 54,9<br>(9,4)  | 42,6<br>(3,3)  | 57,3<br>(0,0) | 66,6<br>(2,9)  | 59,5<br>(11,5) | 52,1<br>(0,7)  | 53,9    | 8,6  | 16,0   |
| tM1 <sub>ep</sub>   | 2,6<br>(13,1)  | 3,5<br>(0,3)  | 2,6<br>(8,4)   | 2,4<br>(1,7)  | 2,5<br>(1,0)   | 2,7<br>(6,0)   | 2,6<br>(9,6)   | 2,5<br>(3,8)   | 2,8<br>(0,0)  | 2,9<br>(5,9)   | 2,9<br>(15,0)  | 2,7<br>(2,0)   | 2,7     | 0,33 | 12,0   |
| St1 <sub>ep</sub>   | 0,4<br>(44,8)  | 1,7<br>(88,9) | 0,5<br>(21,8)  | 1,7<br>(62,2) | 1,8<br>(86,9)  | 0,6<br>(27,6)  | 0,4<br>(43,3)  | 1,5<br>(76,1)  | 0,8<br>(0,0)  | 0,7<br>(27,5)  | 0,6<br>(4,5)   | 0,9<br>(4,0)   | 1,0     | 0,77 | 79,9   |
| C1m <sub>ep</sub>   | 48,2<br>(6,3)  | 47,1<br>(0,6) | 46,8<br>(2,9)  | 33,6<br>(1,5) | 36,2<br>(0,2)  | 43,9<br>(1,7)  | 46,0<br>(4,3)  | 35,3<br>(0,2)  | 45,5<br>(0,0) | 55,8<br>(1,9)  | 51,3<br>(9,9)  | 45,9<br>(0,8)  | 44,6    | 7    | 14,8   |
| tm1 <sub>ep</sub>   | 6,6<br>(17,9)  | 23,5<br>(0,4) | 6,8<br>(5,2)   | 24,2<br>(0,2) | 8,8<br>(9,0)   | 6,5<br>(12,5)  | 6,1<br>(22,0)  | 17,7<br>(23,0) | 11,8<br>(0,0) | 8,5<br>(18,1)  | 7,9<br>(8,0)   | 8,3<br>(4,4)   | 11,4    | 6,57 | 57,6   |
| Af1 <sub>ep</sub>   | 10,0<br>(14,7) | 18,7<br>(3,5) | 9,4<br>(10,1)  | 10,4<br>(5,9) | 4,2<br>(21,4)  | 5,3<br>(3,6)   | 8,8<br>(39,0)  | 7,2<br>(18,9)  | 11,8<br>(0,0) | 10,7<br>(7,4)  | 8,2<br>(22,0)  | 6,2<br>(1,7)   | 9,2     | 3,79 | 41,1   |
| tA1 <sub>ep</sub>   | 4,0<br>(32,5)  | 20,0<br>(0,4) | 4,1<br>(13,9)  | 21,8<br>(0,4) | 6,4<br>(13,0)  | 3,8<br>(17,2)  | 3,6<br>(31,9)  | 15,2<br>(26,2) | 9,0<br>(0,0)  | 5,6<br>(30,6)  | 5,1<br>(4,0)   | 5,6<br>(7,4)   | 8,7     | 6,49 | 74,9   |
| CM2 <sub>ep</sub>   | 57,4<br>(4,8)  | nd<br>nd      | 51,5<br>(0,1)  | nd<br>nd      | 41,8<br>(0,5)  | 49,2<br>(0,1)  | 50,2<br>(5,3)  | nd<br>nd       | 48,6<br>(0,0) | 59,1<br>(1,1)  | 54,6<br>(6,2)  | 48,9<br>(1,6)  | 51,3    | 5,2  | 10,2   |
| tM2 <sub>ep</sub>   | 17,2<br>(15,3) | nd<br>nd      | 13,2<br>(17,0) | nd<br>nd      | 21,2<br>(5,0)  | 15,0<br>(14,2) | 13,8<br>(11,6) | nd<br>nd       | 19,2<br>(0,0) | 10,0<br>(6,8)  | 13,9<br>(43,6) | 17,4<br>(21,5) | 15,7    | 3,92 | 25,0   |
| St2 <sub>ep</sub>   | 3,5<br>(23,9)  | nd<br>nd      | 2,6<br>(3,8)   | nd<br>nd      | 5,0<br>(31,8)  | 1,9<br>(71,1)  | 4,3<br>(14,4)  | nd<br>nd       | 5,9<br>(0,0)  | 1,4<br>(57,2)  | 4,9<br>nd      | 8,1<br>(35,6)  | 4,1     | 2,29 | 55,3   |
| St3 <sub>ep</sub>   | 9,4<br>(3,1)   | nd<br>nd      | 4,7<br>(31,4)  | nd<br>nd      | nd<br>nd       | 5,9<br>(78,9)  | 11,5<br>(6,4)  | nd<br>nd       | nd<br>nd      | 5,2<br>(24,5)  | 11,2<br>(52,9) | nd<br>nd       | 8,0     | 3,78 | 47,2   |
| Raf <sub>ep</sub>   | 9,2<br>(2,9)   | nd<br>nd      | 4,7<br>(28,3)  | nd<br>nd      | 5,7<br>(3,0)   | 5,4<br>(15,3)  | 4,2<br>(16,5)  | nd<br>nd       | 3,1<br>(0,0)  | 3,3<br>(13,1)  | 3,3<br>(51,4)  | 3,1<br>(13,6)  | 4,7     | 2,01 | 43,2   |
| tRa <sub>ep</sub>   | 10,6<br>(13,8) | nd<br>nd      | 6,4<br>(29,4)  | nd<br>nd      | 12,4<br>(14,9) | 8,5<br>(34,6)  | 7,7<br>(3,3)   | nd<br>nd       | 7,4<br>(0,0)  | 1,5<br>(58,0)  | 5,9<br>(112,8) | 9,1<br>(37,1)  | 7,7     | 3,67 | 47,5   |
| Cfin <sub>ep</sub>  | 52,6<br>(2,2)  | nd<br>nd      | 45,9<br>(0,0)  | nd<br>nd      | 40,3<br>(0,1)  | 45,0<br>(1,5)  | 47,2<br>(6,1)  | nd<br>nd       | 46,5<br>(0,0) | 52,0<br>(0,1)  | 49,5<br>(4,2)  | 46,5<br>(0,5)  | 47,3    | 3,7  | 7,9    |
| Af2 <sub>ep</sub>   | 4,8<br>(33,3)  | nd<br>nd      | 5,6<br>(1,0)   | nd<br>nd      | 1,5<br>(12,8)  | 4,2<br>(16,9)  | 3,0<br>(50,7)  | nd<br>nd       | 2,2<br>(0,0)  | 7,1<br>(9,5)   | 5,1<br>(25,7)  | 2,4<br>(24,6)  | 4,0     | 1,92 | 48,1   |

## 7.5 Annexe 5 :

*Journal of the Science of Food and Agriculture**J Sci Food Agric* 86:1688–1698 (2006)

# Discrimination of wheat varieties by simultaneous measurements of oxygen consumption and consistency of flour dough during mixing

Loïc Lewavasseur,<sup>1</sup> Lalatiana Rakotozafy,<sup>1</sup> Elise Manceau,<sup>1</sup> Loïc Louarme,<sup>1</sup> Hugues Robert,<sup>2</sup> Jean-Luc Baret,<sup>2</sup> Jacques Potus<sup>1</sup> and Jacques Nicolas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Chaire de Biochimie IA, UMR SCALF 1211 (INRA/ONAM/INRA), INRA, 262 Rue Saint-Martin, Case 305, F-75247 Paris Cedex 03, France

<sup>2</sup>Le Soufflet SA, Quai Seneval, BP 12, F-10400 Nogent sur Seine, France

**Abstract:** Using an instrumented mixing reactor, oxygen consumption and torque evolution were recorded during the mixing of wheat flour doughs from eight pure French wheat varieties harvested in 2002 and 2003. Wheat flours were also characterized by biochemical analyses including lipoxygenase (LOX) activity assay, free polyunsaturated fatty acid (PUFA) content, glutathione and ferulic acid contents, results of alveograph and firmograph tests and breadmaking performances. Some parameters defined from the obtained torque curves, equivalent to consistency curves, were correlated with alveograph and firmograph data. The importance of LOX activity levels and free PUFA content to explain the oxygen consumption during mixing is confirmed. In addition to the characteristics of the oxygen consumption curves, the extent to which the consistency curve parameters are able to differentiate among doughs made with flours from different wheat varieties is considered.

© 2006 Society of Chemical Industry

**Keywords:** mixing; oxygen; consistency; wheat; discrimination; lipoxygenase

## INTRODUCTION

Dough is a complex mixture of starch, water, protein, fat and salt. Mixing has three important functions: it blends the ingredients into a macroscopically homogeneous mass, it develops the dough through a three-dimensional viscoelastic structure with gas-retaining properties and it incorporates air. During mixing, several components of dough present in the lipid, gluten and arabinoxylan (pentosan) fractions or ascorbic acid (when added) can be oxidised by enzymes using O<sub>2</sub> as substrate. These enzymes may be either present (endogenous) in wheat flour (e.g. lipoxygenase (LOX), peroxidase, polyphenol oxidase or ascorbate oxidase) or intentionally added (exogenous) to the dough recipe (e.g. soybean LOX or peroxidase, fungal glucose oxidase or laccase). Thus oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the monacylglycerol and free forms by wheat LOX in the presence of O<sub>2</sub> also leads to the co-oxidation of different endogenous dough substrates (thiols, carotenoids, etc.).<sup>1</sup> Oxidation of gluten can lead to rearrangement of intra-inter-chain disulfide bonds<sup>2</sup> as well as dipeptide bonds,<sup>3</sup> improving the stability of the gluten matrix and resulting in modified dough rheological characteristics. The oxidation of ferulic acid moieties in arabinoxylans catalysed by laccase

in the presence of oxygen or by peroxidase in the presence of hydrogen peroxide (formed during glucose oxidation by glucose oxidase) leads to the formation of disulfate or disulfide bridges,<sup>4</sup> resulting in the gelation of pentosans causing rheological changes of dough.<sup>1</sup> The increase in dough mixing tolerance due to LOX activity can be explained by the free radicals released by this enzyme in the lipid fraction.<sup>5</sup> It has been recognised that the rheological properties of dough play a significant role in its handling properties during processing and in the quality of the final bread<sup>7</sup> and that aeration during dough mixing is critical to achieve a bread with good volume, structure and texture.<sup>8</sup> The interest of oxygen in the baking industry is increasing, because it is now established that the action of certain improvers depends on oxygen availability during mixing.<sup>9,10</sup>

At the beginning of mixing, several O<sub>2</sub>-requiring reactions in dough compete for the low amount of dissolved O<sub>2</sub> in the aqueous phase of bread dough. This amount, corresponding to the solubility of O<sub>2</sub> in water (0.24 μmol L<sup>-1</sup> at 25 °C), represents approximately 0.15 μmol O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> flour. According to Eycum *et al.*,<sup>11</sup> this quantity of O<sub>2</sub> is consumed in the first minute of mixing, meaning that wheat flour dough becomes anaerobic at the very beginning of

\*Correspondence to: Jacques Nicolas, Chaire de Biochimie IA, UMR SCALF 1211 (INRA/ONAM/INRA), INRA, 262 Rue Saint-Martin, Case 305, F-75247 Paris Cedex 03, France

E-mail: nicolas@maris.fr

Received 25 July 2005; revised version received 16 January 2006; accepted 17 February 2006

Published online 14 June 2006; DOI: 10.1002/jsfa.2388

mixing. Therefore the extent of redox reactions during mixing is largely dependent on the efficiency of oxygen incorporation in dough by the type of mixer used.

Many reports describe the study of mixing under controlled atmospheres,<sup>11,12</sup> and the fact that the oxygen uptake by aqueous suspensions of flour samples is mainly due to wheat LOX-catalysed oxidation of endogenous free PUFA<sup>13–16</sup> has been well documented. Using an instrumented mixing reactor, we were able to follow the depletion of O<sub>2</sub> in surrounding air during the mixing of white flour<sup>16,17</sup> and to detect the effects of flour supplementation by some exogenous enzymes<sup>17</sup> (glucose oxidase and lipase) on oxygen consumption. Thus, for doughs made with wheat flour without additives, the free PUFA content and LOX activity in flour are the main factors explaining the oxygen uptake during mixing.<sup>18</sup>

In addition to O<sub>2</sub> consumption, this instrumented mixing bioreactor also allows the measurement of torque during mixing.<sup>16,18,19</sup> In the present study we aimed to establish if both oxygen uptake and consistency curves can be used to discriminate wheat varieties. We also investigated if some characteristics of these curves can be correlated with biochemical and rheological data of flours or with their breadmaking performances.

## EXPERIMENTAL

### Flours

Seven flours obtained from industrial milling of pure wheat varieties Apache (AP), Antec (AZ), Cap Horn (CH), Cevantis (CR), Shango (SH), Seasons (SO) and Isengrain (IS) and a commercial flour (CF) for two years of harvesting (2002 and 2003) were provided by Soufflet SA (Nogent sur Seine, France). The wheat varieties were harvested during only one year (CH03 and IS02) or both years (AP02, AP03, AZ02, AZ03, CR02, CR03, SH02, SH03, SO02 and SO03) and the flours were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Methods

Lipoxygenase (LOX) activity and the amounts of polyunsaturated fatty acids in the monoacylglycerol and free fatty acid fractions (oxidisable PUFA) of flours were determined according to Delcroix *et al.*<sup>18</sup> and Castello *et al.*<sup>19</sup> respectively.

Total (free and esterified) ferulic acid determination was adapted from Peyron *et al.*<sup>20</sup> Flour samples (450 mg) were suspended in distilled and deoxygenated water (2.5 mL). The internal standard 3,4,5-trimethoxybenzoic acid (TMCA, 4 mmol L<sup>-1</sup>, 50  $\mu\text{L}$ ) was added to the suspension together with 4 mol L<sup>-1</sup> NaOH (2.5 mL). After 1 h at 35  $^{\circ}\text{C}$  the solution was adjusted to pH 2 with 6 mol L<sup>-1</sup> HCl (2 mL), and phenolic acids were extracted with 3  $\times$  3 mL of ethyl acetate. After centrifugation (800  $\times$  g, 2 min) the ethyl acetate phase was collected and made up to 10 mL. A 2 mL aliquot of this phase was evaporated at 30  $^{\circ}\text{C}$  under vacuum. The dried extract was dissolved

in 500  $\mu\text{L}$  of acetic acid (20 g L<sup>-1</sup>)/acetonitrile (77:23 v/v) and injected (50  $\mu\text{L}$ ) into a Waters (Milford, MA, USA) high-performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a model 600 pump system controller, a model 996 photodiode array detector with Millennium 32 chromatography manager software, a rotary valve (Rheodyne model 8125) fitted with a 50  $\mu\text{L}$  loop, and a C18 YMC ODS column (250 mm  $\times$  4.6 mm ID, ATC, Houillea, France) protected by a guard column (8 mm  $\times$  4 mm ID) of the same material. Isocratic elution was performed with acetic acid (20 g L<sup>-1</sup>)/acetonitrile (77:23 v/v) at 1 mL min<sup>-1</sup> for 35 min. The response factor of ferulic acid was determined from the calibration curve of peak surface extracted at 320 nm versus concentration. All determinations were performed in duplicate.

Reduced form glutathione (GSH) was analysed according to the following procedure. Flour (5 g) was homogenised with *m*-phosphoric acid (30 g L<sup>-1</sup>, 10 mL) in an ice bath using an Ultra Turax homogeniser (IKA Werke, Staufen, Germany) for 15 s followed by a 5 s rest period and another 15 s treatment. The homogenate was immediately centrifuged at 8000  $\times$  g for 15 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  nylon filter and suitably diluted in the HPLC mobile phase before analysis by HPLC/electrochemical detection (ECD) according to Vignaud *et al.*<sup>21</sup>

The percentage of proteins and the Hagberg falling number (HFN) were determined according to AFNOR methods.<sup>22,23</sup> Absograph and farinograph tests were performed according to standardised methods.<sup>24,25</sup> Dough score and loaf volume were obtained according to French BIPEA breadmaking tests.<sup>26</sup> The dough score, empirically given by the baker, takes into account all the characteristics of the dough immediately after mixing and after resting.

Statistical analyses, principal component analysis (PCA) and correlations were carried out using Statgraphics Plus 5.1 for Windows.<sup>27</sup> The correlation coefficient matrices and PCA were computed on the whole data set for both years (2002 and 2003).

### Instrumentation

Torque evolution was recorded using an instrumented mixing bioreactor<sup>18</sup> equipped with a mixer engine/torque recorder (IKAVISC MR-D1, IKA Werke, Staufen, Germany). Oxygen consumption was recorded during mixing and the data were analysed according to Eycourt *et al.*<sup>16</sup>

The recipe used for mixing was 325 g of flour, 227.5 g of water and 6.5 g of NaCl. Owing to the mechanical limits of our apparatus, the dough was systematically over-hydrated. Mixing was performed at 30  $^{\circ}\text{C}$  and 200 rpm for 60 min. The relevance of mixing for up to 60 min was to emphasise the phenomenon of oxygen consumption during mixing. Each mixing was carried out at least in duplicate, except for AZ02 flour.



## RESULTS AND DISCUSSION

## Aleo-graph and farinograph data and breadmaking performances

Table 1 shows the results obtained for the aleo-graph and farinograph tests and breadmaking performances. For the aleo-graph data, wheat flours of 2003 were stronger than those of 2002, with an average  $W^b$  value of  $231 \times 10^{-4}$  compared with  $174 \times 10^{-4} \text{ J g}^{-1}$  dough, and exhibited a higher dough-swelling capacity (average  $G$  of 25.2 compared with 21.5). The average  $P/L$  value for 2003 flours was lower than for 2002 flours (0.51 and 0.63 respectively).

For the farinograph data, considering both years, OR03 exhibited the highest water-absorbing capacity flour (WACF) value, i.e. 59.9, while SH02 showed the lowest value, i.e. 40. The degree of weakening after 12 min of mixing observed in the farinograph test (Weak 12 min) varied from 40 (SC) to 100 (OR) in 2003 and from 80 (IS, AP and CF) to 120 (AZ and SH) in 2002. Wheat flours of 2003 showed better stability on mixing than those of 2002, with an average Weak 12 min value of only 73 compared with 97.

Dough scores ranged from 75 (CH) to 98.5 (AP) in 2003 and from 62 (IS) to 91 (AZ) in 2002. Leaf volumes varied from 1406 (IS) to 1956  $\text{cm}^3$  (AP) in 2002 and from 1622 (AZ) to 1870  $\text{cm}^3$  (CF) in 2003.

## Biochemical data

The biochemical characteristics of the flours are given in Table 2. The LOX activity of the 2003 flours varied from 34.8 (SC) to  $74.6 \text{ nkat g}^{-1}$  dry mass (DM) (CH). In 2002, IS exhibited the lowest value ( $20.3 \text{ nkat g}^{-1}$  DM) while AZ had the highest value ( $98.7 \text{ nkat g}^{-1}$  DM). In 2003, wheat flour varieties

had homogeneous values of oxidisable PUFA content with an average of  $1.47 \mu\text{mol g}^{-1}$  DM, leading to a coefficient of variation (CV) below 16%. In 2002 the values were more dispersed (CV ~50%), with IS exhibiting the lowest content ( $1.63 \mu\text{mol g}^{-1}$  DM) and CF the highest ( $5.24 \mu\text{mol g}^{-1}$  DM). Both mean LOX activity and mean oxidisable PUFA were within the ranges of values reported in a previous study on eight French wheat varieties (year 1999).<sup>19</sup>

In 2003 the mean GSH content ranged from 32 to  $134 \text{ nmol g}^{-1}$  DM, while in 2002 it varied from 12 to  $280 \text{ nmol g}^{-1}$  DM. Except for SH02, which showed the highest level, these values were of the same order of magnitude as those presented by other authors.<sup>2,20</sup> The average values of total ferulic acid content were  $510 \text{ nmol g}^{-1}$  DM in 2003 and  $409 \text{ nmol g}^{-1}$  DM in 2002. In their varietal study in 1999, Eymour *et al.*<sup>19</sup> found an average value of  $492 \text{ nmol g}^{-1}$  DM.

Protein contents and HFN values of the 2003 flours were higher than those of the 2002 flours.

## Oxygen consumption data

The curves of  $\text{O}_2$  uptake versus time were approximated by polynomials of fourth degree and the instant rates of  $\text{O}_2$  uptake ( $V_t\text{O}_2$ ) were calculated at times  $t$  (min) of mixing.<sup>18</sup> Three phases were distinguished during mixing to calculate the instant rates of  $\text{O}_2$  uptake: the initial ( $V_i\text{O}_2$ ), intermediary ( $V_{21}\text{O}_2$ ) and final ( $V_{100}\text{O}_2$ ) phases. Table 3 gives the results of oxygen consumption during mixing of the studied flours.

Mean total  $\text{O}_2$  uptakes varied from 1.69 (IS) to  $7.76 \mu\text{mol g}^{-1}$  DM (OR) in 2002 and from 3.25 (AP) to  $5.70 \mu\text{mol g}^{-1}$  DM (CH) in 2003. Initial rates of oxygen uptake varied from 0.05 (IS) to

Table 1. Aleo-graph and farinograph data and breadmaking performances of the different wheat flour varieties\*

| Variety | $W^b$ ( $10^{-4} \text{ J g}^{-1}$ dough) | $G$         | $P/L^c$     | WACF        | Weak 12 min <sup>d</sup> | Dough score | Leaf volume ( $\text{cm}^3$ ) |
|---------|---|-------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------------------------|
| CF03    | ND  | ND          | ND          | ND          | ND                       | 91          | 1870                          |
| AP03    | 253                                       | 26.2        | 0.45        | 58.1        | 60                       | <b>98.5</b> | 1841                          |
| AB03    | 196                                       | 25.5        | 0.4         | 54.7        | 60                       | 77          | 1622                          |
| CH03    | <b>300</b>                                | 24          | 0.69        | 58.9        | 70                       | 75          | 1831                          |
| OR03    | 193                                       | 21.7        | 0.76        | <b>59.9</b> | 100                      | 77          | 1622                          |
| SH03    | 200                                       | 25.5        | 0.4         | 54.9        | 80                       | 86          | 1791                          |
| SC03    | 246                                       | <b>26.1</b> | <b>0.24</b> | 55.4        | <b>40</b>                | 82          | 1700                          |
| Average | 231                                       | 25.2        | 0.51        | 57          | 73                       | 84          | 1725                          |
| SD      | 43  | 2.2         | 0.17        | 2           | 22                       | 9           | 104                           |
| CF02    | ND  | ND          | ND          | 58.1        | 80                       | ND          | ND                            |
| AP02    | 163                                       | 23.2        | 0.49        | 55          | 80                       | 85          | <b>1926</b>                   |
| AB02    | <b>90</b>                                 | 20.8        | 0.46        | 54          | <b>120</b>               | 91          | 1630                          |
| IS02    | 156                                       | 20.8        | 0.55        | 52.5        | 80                       | <b>62</b>   | <b>1406</b>                   |
| OR02    | 181                                       | <b>19.9</b> | <b>0.59</b> | 50          | 100                      | 78          | 1466                          |
| SH02    | 157                                       | 20.4        | 0.7         | 59          | <b>120</b>               | 89          | 1730                          |
| SC02    | 203                                       | 23.9        | 0.65        | <b>40</b>   | ND                       | 81          | 1613                          |
| Average | 174                                       | 21.5        | 0.63        | 54          | 97                       | 81          | 1634                          |
| SD      | 66  | 1.6         | 0.17        | 7           | 20                       | 10          | 197                           |

\* Bold type, maxima (and minimal values); ND, not determined; SD, standard deviation.

<sup>b</sup>  $P$ : tenacity (maximum pressure reached blowing the dough piece to replace);  $L$ : extensibility (length of the curve);  $P/L$ : is the ratio of elastic to viscous properties of dough.

<sup>c</sup> Degree of weakening between the consistency obtained at the development peak of the dough and the consistency of the dough 12 min later.<sup>14</sup>

**Table 2.** Biochemical data (mean  $\pm$  standard deviation) of the different wheat flour varieties\*

| Variety | LOX<br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ) | Oxidizable PUFA<br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ) | GSH<br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ) | Ferulic acid<br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ) | Proteins<br>(%) | HFN<br>(%) |
|---------|---|---|---|--|-----------------|------------|
| CFO3    | 51.8 $\pm$ 2.8                              | 1.48 $\pm$ 0.2  | <b>32 <math>\pm</math> 7</b>                | 495 $\pm$ 7  | 11.55           | ND         |
| AP03    | 47.1 $\pm$ 4.3                              | 1.22 $\pm$ 0.2  | 72 $\pm$ 15                                 | 390 $\pm$ 21   | 11.65           | 30b        |
| AZ03    | 50.1 $\pm$ 3.4                              | 1.58 $\pm$ 0.1  | 134 $\pm$ 18                                | 580 $\pm$ 2  | 12              | 400        |
| CH03    | 74.6 $\pm$ 5.6                              | 1.55 $\pm$ 0.24   | 109 $\pm$ 20                                | <b>595 <math>\pm</math> 6</b>                        | <b>12.28</b>    | 407        |
| OR03    | 58.5 $\pm$ 2.4                              | <b>1.14 <math>\pm</math> 0.14</b>                       | 53 $\pm$ 12                                 | 577 $\pm$ 7  | 11.4            | <b>409</b> |
| SH03    | 52.0 $\pm$ 1.5                              | 1.40 $\pm$ 0.14   | 61 $\pm$ 15                                 | 470 $\pm$ 24   | 10.55           | ND         |
| SC03    | 34.8 $\pm$ 3.4                              | 1.76 $\pm$ 0.18   | 89 $\pm$ 20                                 | 471 $\pm$ 7  | 12.4            | 418        |
| Average | 54.0  | 1.47  | 78.4  | 510  | 11.7            | 406        |
| SD      | 12.2  | 0.23  | 34.8  | 70.6   | 0.64            | 7.95       |
| CFO2    | 45.3 $\pm$ 2.1                              | <b>5.24 <math>\pm</math> 0.48</b>                       | 50 $\pm$ 15                                 | 396 $\pm$ 12   | 10.9            | ND         |
| AP02    | 57.9 $\pm$ 2.7                              | 3.39 $\pm$ 0.06   | 120 $\pm$ 10                                | <b>310 <math>\pm</math> 22</b>                       | 10.1            | 300        |
| AZ02    | <b>98.7 <math>\pm</math> 1.5</b>            | 2.37 $\pm$ 0.03   | 140 $\pm$ 20                                | 532 $\pm$ 37   | 10.05           | 346        |
| IS02    | <b>30.3 <math>\pm</math> 0.9</b>            | 1.63 $\pm$ 0.14   | 12 $\pm$ 11                                 | 315 $\pm$ 10   | 10.1            | 38.6       |
| OR02    | 65.2 $\pm$ 3.2                              | 5.15 $\pm$ 0.11   | 70 $\pm$ 10                                 | 477 $\pm$ 39   | <b>9.7</b>      | 318        |
| SH02    | 63.4 $\pm$ 4.5                              | 2.04 $\pm$ 0.07   | <b>590 <math>\pm</math> 17</b>              | 473 $\pm$ 6  | 10.1            | <b>491</b> |
| SC02    | 23.8 $\pm$ 2.5                              | 2.10 $\pm$ 0.13   | 40 $\pm$ 13                                 | 359 $\pm$ 20   | 11              | 367        |
| Average | 55.4  | 3.13  | 102   | 409  | 10.3            | 318        |
| SD      | 29.1  | 1.51  | 60.5  | 85.8   | 0.48            | 69.7       |

\*Bold type, maximal and minimal values; SD, standard deviation; ND, not determined.

**Table 3.** Total oxygen uptake after 1 h of mixing and initial rates of oxygen uptake during the initial ( $V_{iO_2}$ ), intermediary ( $V_{mO_2}$ ) and final ( $V_{fO_2}$ ) phases of mixing for the different wheat flour varieties (mean  $\pm$  standard deviation)\*

| Variety | Total $O_2$<br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ) | $V_{iO_2}$ <sup>b</sup><br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$ ) | $V_{mO_2}$ <sup>c</sup><br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$ ) | $V_{fO_2}$ <sup>d</sup><br>( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$ ) |
|---------|---|--|--|--|
| CFO3    | 4.05 $\pm$ 0.07                                     | 0.18 $\pm$ 0.01  | 0.09 $\pm$ 0.001   | 0.03 $\pm$ 0.003   |
| AP03    | 3.25 $\pm$ 0.06                                     | 0.16 $\pm$ 0.01  | 0.05 $\pm$ 0.004   | <b>0.02 <math>\pm</math> 0.001</b>                                       |
| AZ03    | 4.55 $\pm$ 0.08                                     | 0.20 $\pm$ 0.01  | 0.07 $\pm$ 0.001   | 0.04 $\pm$ 0.002   |
| CH03    | 5.70 $\pm$ 0.16                                     | 0.24 $\pm$ 0.01  | 0.10 $\pm$ 0.01  | 0.04 $\pm$ 0.004   |
| OR03    | 3.95 $\pm$ 0.18                                     | 0.16 $\pm$ 0.01  | 0.07 $\pm$ 0.004   | 0.03 $\pm$ 0.002   |
| SH03    | 3.29 $\pm$ 0.16                                     | 0.16 $\pm$ 0.01  | 0.05 $\pm$ 0.01  | <b>0.02 <math>\pm</math> 0.002</b>                                       |
| SC03    | 3.93 $\pm$ 0.07                                     | 0.16 $\pm$ 0.01  | 0.07 $\pm$ 0.001   | <b>0.02 <math>\pm</math> 0.001</b>                                       |
| Average | 4.07  | 0.18   | 0.07   | 0.03   |
| SD      | 0.84  | 0.03   | 0.02   | 0.01   |
| CFO2    | 7.06 $\pm$ 0.15                                     | <b>0.32 <math>\pm</math> 0.01</b>  | <b>0.13 <math>\pm</math> 0.01</b>  | 0.03 $\pm$ 0.01  |
| AP02    | 6.40 $\pm$ 0.04                                     | 0.27 $\pm$ 0.01  | 0.12 $\pm$ 0.003   | 0.04 $\pm$ 0.002   |
| AZ02    | 5.53  | 0.22   | 0.10   | 0.05   |
| IS02    | <b>1.89 <math>\pm</math> 0.02</b>                   | <b>0.05 <math>\pm</math> 0.01</b>  | <b>0.03 <math>\pm</math> 0</b>   | <b>0.02 <math>\pm</math> 0.002</b>                                       |
| OR02    | <b>7.76 <math>\pm</math> 0.48</b>                   | 0.29 $\pm$ 0.01  | <b>0.13 <math>\pm</math> 0.01</b>  | <b>0.06 <math>\pm</math> 0.01</b>  |
| SH02    | 4.46 $\pm$ 0.23                                     | 0.21 $\pm$ 0.01  | 0.07 $\pm$ 0.01  | 0.03 $\pm$ 0.003   |
| SC02    | 3.41 $\pm$ 0.14                                     | 0.15 $\pm$ 0.01  | 0.06 $\pm$ 0.003   | <b>0.02 <math>\pm</math> 0.002</b>                                       |
| Average | 5.28  | 0.22   | 0.08   | 0.04   |
| SD      | 2.07  | 0.03   | 0.04   | 0.02   |

\*Bold type, maximal and minimal values; SD, standard deviation.

<sup>b</sup>Initial rate of oxygen uptake after 4 min of mixing.<sup>c</sup>Initial rate of oxygen uptake after 24 min of mixing.<sup>d</sup>Initial rate of oxygen uptake after 40 min of mixing.

0.32  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$  (CF) in 2002 and from 0.16 (SH, AP, OR and SC) to 0.24  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$  (CH) in 2003. The rates during the intermediary phase of mixing ranged from 0.03 (IS) to 0.13  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$  (CF and OR) in 2002 and from 0.05 (AP and SH) to 0.10  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$  (CH) in 2003. The final phase values ranged from 0.02 (IS and SC) to 0.08  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$  (OR) in 2002 and from 0.02 (AP, SH and SC) to 0.04  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DM min}^{-1}$  (CH and AZ) in 2003.

Whatever the parameters of  $O_2$  uptake considered, the CV was always higher in 2002 compared with 2003. This result is probably due to the higher variation in oxidizable PUFA contents observed for flour varieties in 2002 than for those in 2003 (Table 2).

#### Torque evolution curve (consistency curve)

The torque evolution curve can be considered as the consistency curve of the dough (Fig. 1). At the

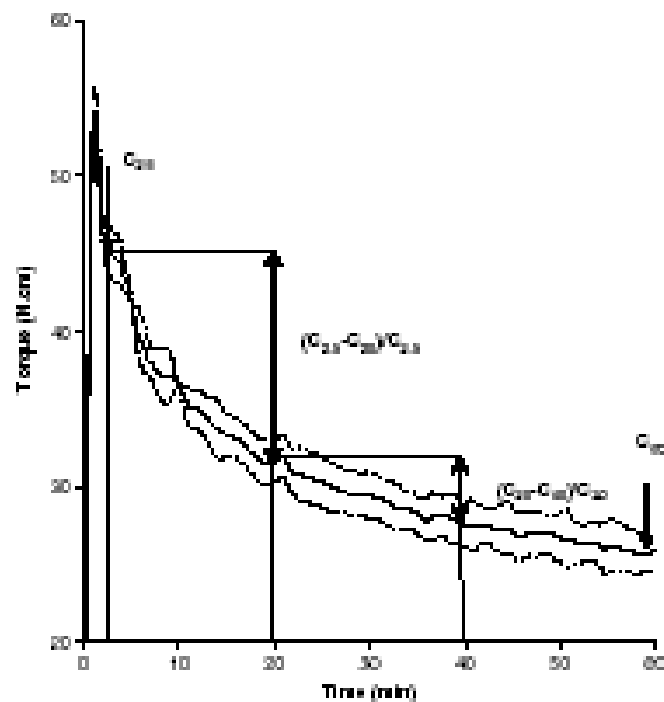


Figure 1. Torque evolution during mixing of wheat flour dough: definition of parameters.

beginning of mixing, the resistance of the dough to deformation (consistency) is low, as shown by the low torque values. With time, this resistance increases until a maximum, described as the peak dough development value, is reached. As mixing continues, the dough consistency decreases. This phenomenon could be attributed to depolymerisation of the gluten network and is characterised by partial solubilisation of the insoluble gluten proteins.<sup>20</sup> Particularly, the glutenin macropolymer (GMP), which is the glutenin fraction insoluble in 15 g L<sup>-1</sup> sodium dodecyl sulfate (SDS), decreases as the mixing time increases, leading to an increase in the intrinsic viscosity of the SDS-soluble glutenin until the peak dough development time.<sup>20</sup> According to the same authors, further mixing beyond the peak dough development time leads to dissociation of the glutenin particles into smaller fragments, which results in a decrease in the intrinsic viscosity of the SDS-soluble glutenin aggregate. However, owing to the large difference in energy input of our mixing conditions,<sup>20</sup> the state of the dough obtained at our peak dough development time is probably very different from that obtained by Don et al.<sup>20</sup>

For CIF in 2002 the consistency reached a value of 46.8 N cm at 2.5 min ( $C_{2.5}$ ) (Fig. 1). It then decreased rapidly until 20 min of mixing and reached a value of 32.5 N cm. This was followed by a slower decrease to 26.0 N cm at the end of mixing, representing a consistency loss of 44% compared with the  $C_{2.5}$  value. The mean CV of the curve was calculated from three replicates. At the beginning of mixing (between 0 and

2 min) the mean CV was higher than 8%, showing the lack of reproducibility for torque values in this period of mixing due to the formation of dough. After 2 min the dough can be considered homogeneous. From 2.5 min until the end of mixing (60 min), the mean CV was less than 5%.

Three parameters have been extracted from the torque curve to characterise the dough consistency (Fig. 1).

- $C_{2.5}$  represented the torque value at time  $t = 2.5$  min after the beginning of consistency.
- $(C_{2.5} - C_{20})/C_{2.5}$  and  $(C_{20} - C_{60})/C_{20}$  (%) were used to characterise the weakening of the dough in the initial and intermediary phases of mixing respectively.
- $C_{60}$  represented the torque value at the end of mixing (60 min).

The results obtained for each variety are presented in Table 4. In 2002 the  $C_{2.5}$  values ranged from 19.3 (IS) to 46.8 N cm (CIF). In 2003 the  $C_{2.5}$  values were close to those of 2002 but less dispersed, with 28.3 (SH) for the minimum and 43.7 N cm (CH) for the maximum. The dough weakening in the initial phase of mixing ranged from 19.2 (AZ) to 38.0% (SH) in 2002 and from 18.1 (AP) to 29.3% (SH) in 2003. In the intermediary phase of mixing, it ranged from 4.8 (IS) to 18.4% (SH) in 2002 and from 3.3 (AZ) to 12.8% (SH) in 2003. The final torque values ranged from 12.6 (IS) to 26.1 N cm (OR) in 2002 and from 16.2 (SH) to 28.8 N cm (OR) in 2003. In all cases

the results were more dispersed in 2002 than in 2003. Moreover, the mean values of dough weakening were also higher for flour varieties in 2002 than for those in 2003.

**Correlations between biochemical characteristics and alveograph data, farinograph data and breadmaking performances**

Table 5 shows the Pearson correlation coefficients between some biochemical parameters and empirical rheological measurements and French breadmaking performances. Not surprisingly, the best positive correlation coefficients were observed between the protein content and the alveograph data *W* ( $r = 0.833$ ) and *G* ( $r = 0.827$ ). Concerning the farinograph data, the dough weakening after 12 min was correlated negatively with the protein content ( $r = -0.680$ ). This parameter was also correlated positively with LOX activity ( $r = 0.650$ ) and negatively with HFN ( $r = -0.629$ ). Lastly, the ferulic acid content was correlated with WACF ( $r = 0.633$ ). All other correlation coefficients were less than 0.6 (absolute value),

including those involving the French breadmaking performances.

**Correlations between oxygen consumption curves, biochemical characteristics, alveograph data, farinograph data and breadmaking performances**

The oxygen consumption parameters during dough mixing (total oxygen uptake and instant rates of oxygen consumption) were mainly correlated with LOX activity and PUFA content (Table 6). This observation is in agreement with the results of Hyeum *et al.*<sup>10</sup> Except for the correlation coefficient between *P/L* and  $V_{90}O_2$ , none of the correlation coefficients between the oxygen consumption parameters and the alveograph data, farinograph data and French breadmaking performances exhibited an absolute value higher than 0.6.

**Correlations between consistency curves, biochemical characteristics, alveograph data, farinograph data and breadmaking performances**

Table 7 shows the Pearson correlation coefficients between the parameters extracted from the consistency curves and some biochemical parameters, empirical rheological measurements and French breadmaking performances.

The close relationships between  $C_{2.5}$  and WACF on the one hand ( $r = 0.870$ ) and between  $(C_{20} - C_{10})/C_{2.5}$  and Weak 12 min on the other hand ( $r = 0.459$ ) were not surprising because of the obvious similarities between the farinograph curve and the consistency curve obtained with our instrumented bioreactor. Concerning the alveograph data, *P/L*, which represents the ratio of elastic to viscous properties of dough, was also correlated positively with  $C_{2.5}$  ( $r = 0.721$ ) and  $(C_{2.5} - C_{10})/C_{2.5}$  ( $r = 0.565$ ). No correlation was observed between the consistency parameters and the French breadmaking performances.

Concerning the biochemical data,  $C_{2.5}$  was correlated positively with LOX ( $r = 0.697$ ) and ferulic acid ( $r = 0.673$ ). In addition, when the correlation coefficients were computed on the whole data set for both years, no correlation between  $C_{2.5}$  and oxidizable

**Table 4.** Consistency parameter values (mean  $\pm$  standard deviation) obtained for doughs made from the different wheat flour varieties\*

| Variety | $C_{2.5}$<br>[N cm]              | $(C_{2.5} - C_{10})/C_{2.5}$<br>[%] | $(C_{20} - C_{10})/C_{20}$<br>[%] | $C_{20}$<br>[N cm]               |
|---------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| CP08    | 32.8 $\pm$ 3.2                   | 27.7 $\pm$ 4.6                      | 11.5 $\pm$ 2.1                    | 20.0 $\pm$ 0.9                   |
| AP08    | 30.1 $\pm$ 1.6                   | <b>16.1 <math>\pm</math> 6.2</b>    | 6.5 $\pm$ 0.8                     | 22.7 $\pm$ 0.4                   |
| A203    | 32.8 $\pm$ 0.9                   | 21.2 $\pm$ 1.8                      | <b>3.9 <math>\pm</math> 1.4</b>   | 22.0 $\pm$ 0.2                   |
| CH08    | 43.7 $\pm$ 2.2                   | 23.1 $\pm$ 4.0                      | 10.0 $\pm$ 1.8                    | 28.7 $\pm$ 0.4                   |
| OP08    | 43.2 $\pm$ 1.5                   | 24.2 $\pm$ 0.7                      | 0.0 $\pm$ 8.4                     | <b>26.9 <math>\pm</math> 0.9</b> |
| SH08    | 28.3 $\pm$ 1.6                   | 29.9 $\pm$ 1.0                      | 12.8 $\pm$ 0.02                   | 16.2 $\pm$ 1.5                   |
| SO03    | 30.9 $\pm$ 2.0                   | 28.4 $\pm$ 6.7                      | 8.9 $\pm$ 1.9                     | 20.0 $\pm$ 2.5                   |
| Average | 34.5                             | 24.6                                | 8.5                               | 22.8                             |
| SD      | 6.3                              | 4.1                                 | 3.3                               | 4.7                              |
| CP02    | <b>44.8 <math>\pm</math> 1.2</b> | 32.5 $\pm$ 1.1                      | 12.8 $\pm$ 0.8                    | 25.0 $\pm$ 1.6                   |
| AP02    | 35.0 $\pm$ 0.4                   | 25.0 $\pm$ 1.0                      | 7.4 $\pm$ 0.5                     | 23.0 $\pm$ 0.6                   |
| A202    | 35.0                             | 19.2                                | 9.1                               | 23.2                             |
| BO2     | <b>49.3 <math>\pm</math> 2.5</b> | 29.4 $\pm$ 4.2                      | 4.8 $\pm$ 2.8                     | <b>12.6 <math>\pm</math> 0.4</b> |
| OP02    | 46.2 $\pm$ 1.8                   | 32.1 $\pm$ 1.8                      | 14.7 $\pm$ 8.1                    | 25.1 $\pm$ 4.4                   |
| SH02    | 37.2 $\pm$ 1.3                   | <b>30.0 <math>\pm</math> 1.6</b>    | <b>18.4 <math>\pm</math> 2.6</b>  | 16.7 $\pm$ 1.1                   |
| SO02    | 32.3 $\pm$ 2.2                   | 27.6 $\pm$ 0.8                      | 8.8 $\pm$ 1.0                     | 20.0 $\pm$ 0.6                   |
| Average | 38.0                             | 29.1                                | 10.9                              | 21.1                             |
| SD      | 9.3                              | 6.0                                 | 4.7                               | 5.0                              |

\*Bold type, maximal and minimal values; SD, standard deviation.

**Table 5.** Pearson correlation coefficients between biochemical characteristics and alveograph data, farinograph data and breadmaking performances\*

|              | Alveograph data |               |               | Farinograph data |               | Breadmaking performances |              |
|--------------|-----------------|---------------|---------------|------------------|---------------|--------------------------|--------------|
|              | <i>W</i>        | <i>G</i>      | <i>P/L</i>    | WACF             | Weak 12 min   | Dough score              | Loaf volume  |
| LOX          | -0.144          | -0.408        | <b>0.408</b>  | <b>0.547</b>     | <b>0.690</b>  | 0.202                    | 0.283        |
| Ox. PUFA     | -0.365          | <b>-0.417</b> | <b>0.415</b>  | 0.070            | 0.276         | -0.042                   | -0.064       |
| Ferulic acid | 0.395           | 0.017         | 0.320         | <b>0.633</b>     | 0.214         | -0.131                   | 0.067        |
| GSH          | -0.182          | -0.132        | 0.016         | 0.233            | <b>0.432</b>  | 0.391                    | <b>0.458</b> |
| Proteins     | <b>0.833</b>    | <b>0.827</b>  | <b>-0.437</b> | 0.062            | <b>-0.680</b> | 0.003                    | 0.286        |
| HFN          | <b>0.558</b>    | <b>0.571</b>  | -0.326        | -0.175           | <b>-0.629</b> | -0.255                   | -0.168       |

\*Bold type, significant coefficient at 65% confidence level; Ox., oxidizable.

L. Lavanant et al.

**Table 6.** Pearson correlation coefficients between oxygen data and biochemical characteristics, alveograph data, farinograph data and bread making performances<sup>a</sup>

|                          |              | Total O <sub>2</sub> | V <sub>1</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>30</sub> O <sub>2</sub> |
|--------------------------|--------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Biochemical data         | LOX          | <b>0.631</b>         | <b>0.696</b>                  | <b>0.596</b>                   | <b>0.530</b>                   |
|                          | Ox. PUFA     | <b>0.779</b>         | <b>0.665</b>                  | <b>0.741</b>                   | <b>0.610</b>                   |
|                          | Ferulic acid | 0.246                | 0.263                         | 0.242                          | 0.270                          |
|                          | GSH          | 0.265                | <b>0.437</b>                  | 0.224                          | 0.079                          |
|                          | Proteins     | -0.270               | -0.176                        | -0.215                         | <b>-0.465</b>                  |
| Alveograph data          | HFN          | -0.357               | -0.412                        | -0.265                         | -0.203                         |
|                          | W            | -0.039               | 0.029                         | 0.027                          | -0.259                         |
|                          | G            | -0.260               | -0.145                        | -0.211                         | <b>-0.519</b>                  |
| Farinograph data         | P/L          | <b>0.455</b>         | 0.340                         | <b>0.451</b>                   | <b>0.622</b>                   |
|                          | WACF         | 0.403                | <b>0.429</b>                  | 0.391                          | 0.340                          |
| Breadmaking performances | Weak 12 min  | 0.262                | 0.251                         | 0.197                          | <b>0.479</b>                   |
|                          | Dough score  | 0.060                | 0.279                         | 0.042                          | -0.126                         |
|                          | Loaf volume  | 0.322                | <b>0.509</b>                  | <b>0.458</b>                   | -0.168                         |

<sup>a</sup> Bold type, significant coefficient at 95% confidence level; Ox., oxidizable.

**Table 7.** Pearson correlation coefficients between consistency parameters and biochemical characteristics, alveograph data, farinograph data and bread making performances<sup>a</sup>

|                          |              | C <sub>2.5</sub> | (C <sub>2.5</sub> - C <sub>20</sub> )/C <sub>2.5</sub> | (C <sub>20</sub> - C <sub>30</sub> )/C <sub>20</sub> | C <sub>30</sub> |
|--------------------------|--------------|------------------|--|--|-----------------|
| Biochemical data         | LOX          | <b>0.657</b>     | 0.033  | <b>0.503</b>   | <b>0.456</b>    |
|                          | Ox. PUFA     | 0.325            | 0.354  | 0.337  | 0.062           |
|                          | Ferulic acid | <b>0.672</b>     | -0.121   | 0.159  | <b>0.623</b>    |
|                          | GSH          | 0.205            | 0.352  | <b>0.475</b>   | -0.157          |
|                          | Proteins     | 0.005            | <b>-0.435</b>  | -0.369   | 0.332           |
| Alveograph data          | HFN          | -0.145           | <b>-0.566</b>  | <b>-0.593</b>  | 0.324           |
|                          | W            | 0.179            | -0.294   | -0.145   | 0.399           |
|                          | G            | -0.319           | -0.303   | <b>-0.472</b>  | 0.019           |
| Farinograph data         | P/L          | <b>0.721</b>     | 0.340  | <b>0.565</b>   | <b>0.416</b>    |
|                          | WACF         | <b>0.670</b>     | 0.162  | <b>0.543</b>   | <b>0.620</b>    |
| Breadmaking performances | Weak 12 min  | 0.366            | 0.277  | <b>0.459</b>   | 0.055           |
|                          | Dough score  | 0.026            | -0.237   | 0.132  | 0.075           |
|                          | Loaf volume  | 0.260            | -0.133   | 0.055  | 0.305           |

<sup>a</sup> Bold type, significant coefficient at 95% confidence level; Ox., oxidizable.

PUFA was observed. However, when the study of the correlation was performed on the data for each year taken separately, the result depended on the year of harvest. For year 2002, C<sub>2.5</sub> was correlated positively with oxidizable PUFA ( $r = 0.79$ ), while no correlation was observed for year 2003 (not shown). This result is probably due to the IS flour, which was not present in the 2003 sampling and which in 2002 exhibited the lowest oxidizable PUFA content associated with the lowest C<sub>2.5</sub> value (in this last case it represents less than 60% of the next higher value, that for SO flour) as shown in Tables 2 and 4.

The dough weakening in the initial period of mixing, (C<sub>2.5</sub> - C<sub>20</sub>)/C<sub>2.5</sub>, was poorly correlated negatively with proteins ( $r = -0.435$ ) and HFN ( $r = -0.566$ ). The weakening in the intermediary period of mixing, (C<sub>20</sub> - C<sub>30</sub>)/C<sub>20</sub>, was poorly correlated positively with LOX ( $r = 0.503$ ) and GSH ( $r = 0.475$ ) but negatively with HFN ( $r = -0.593$ ). The negative correlation coefficients between dough weakening and HFN may be related to the average low values of weakening associated with the average high value of HFN for the 2003 samples, whereas the opposite was observed

for the 2002 samples. The positive correlation between dough weakening and LOX activity, also observed with the farinograph parameter Weak 12min (Table 5), is surprising, since, according to Hoseney *et al.*,<sup>6</sup> LOX is known to increase the dough mixing tolerance.

Lastly, C<sub>30</sub> is also correlated positively with LOX, ferulic acid and WACF.

### Correlations between oxygen consumption and consistency parameters

Pearson correlations between oxygen uptake and consistency parameters are given in Table 8. The best correlation coefficients were obtained between

**Table 8.** Pearson correlation coefficients between consistency parameters and oxygen data<sup>a</sup>

|  | Total O <sub>2</sub> | V <sub>1</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | V <sub>30</sub> O <sub>2</sub> |
|--|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| C <sub>2.5</sub>                                       | <b>0.724</b>         | <b>0.716</b>                  | <b>0.714</b>                   | <b>0.621</b>                   |
| (C <sub>2.5</sub> - C <sub>20</sub> )/C <sub>2.5</sub> | 0.125                | 0.032                         | 0.074                          | 0.104                          |
| (C <sub>20</sub> - C <sub>30</sub> )/C <sub>20</sub>   | 0.405                | 0.360                         | 0.353                          | <b>0.470</b>                   |
| C <sub>30</sub>  | <b>0.512</b>         | <b>0.516</b>                  | <b>0.541</b>                   | 0.356                          |

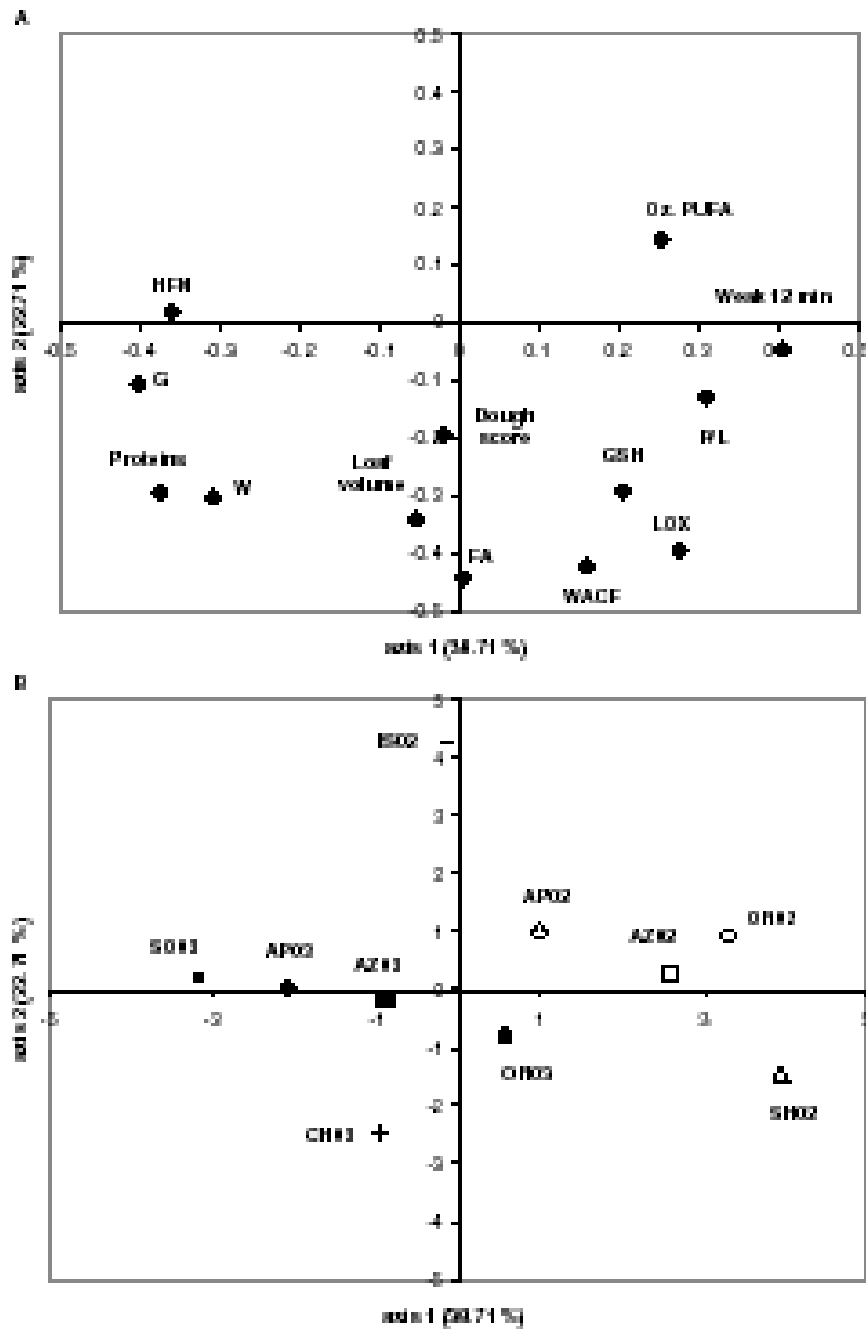
<sup>a</sup> Bold type, significant coefficient at 95% confidence level.

$C_{2,0}$  and total  $O_2$  uptake and the instant rates of  $O_2$  uptake during the three phases of mixing. All these parameters were positively correlated.  $C_{2,0}$  was correlated positively with total  $O_2$  uptake and the instant rates of  $O_2$  uptake during the initial and intermediary phases of mixing. Lastly, the dough weakening in the intermediary period,  $(C_{1,0} - C_{2,0})/C_{2,0}$  was poorly correlated positively with the instant rates of  $O_2$  uptake during the final phase of mixing. Therefore, in our sampling of wheat flours, high

consistencies during mixing are associated with high oxygen uptakes.

**Principal component analysis on biochemical characteristics, alveograph and farinograph results and breadmaking performances**

Biochemical characteristics (six parameters), alveograph and farinograph data (five parameters) and breadmaking performances (two parameters) were used as variables in the first PCA. The projection



**Figure 2.** PCA on biochemical characteristics, alveograph and farinograph results and breadmaking performances: A, projection of variables; B, projection of wheat varieties.

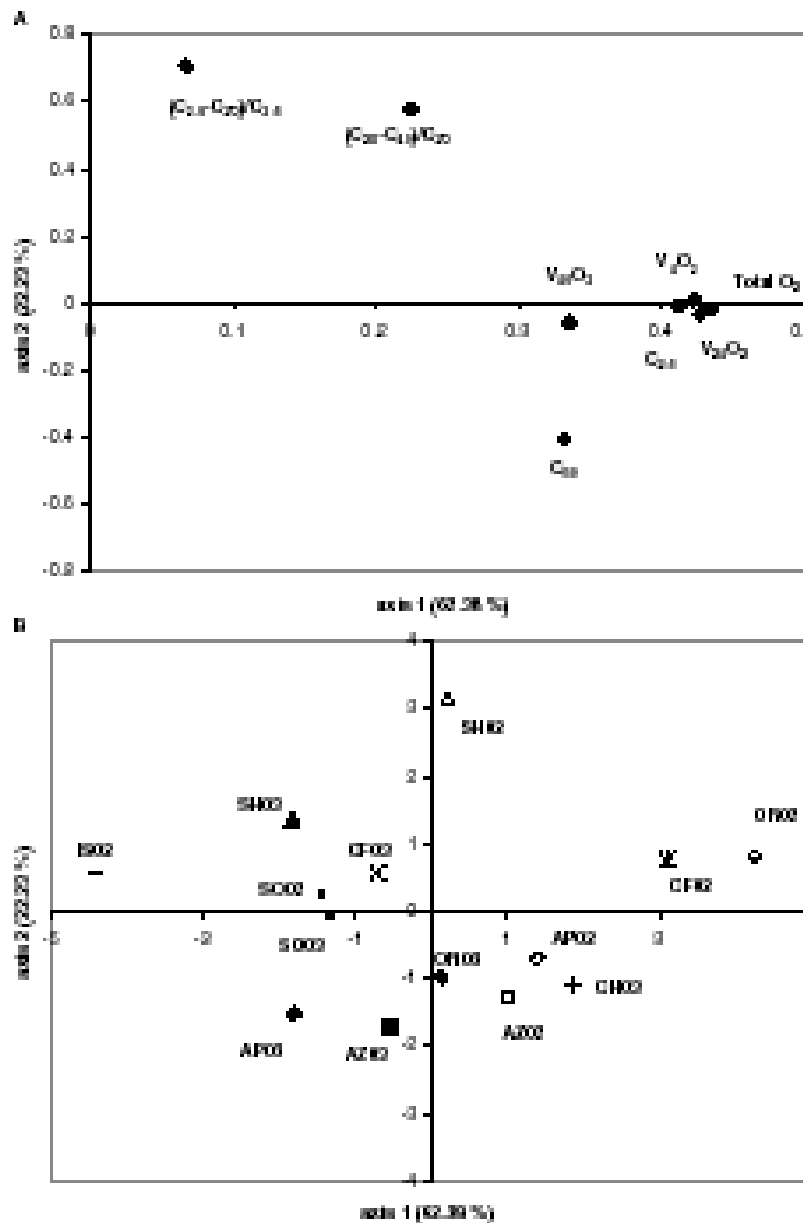
L. Levaillant et al.

of these 13 variables on the plane defined by the first two axes of PCA, which accounted for 38.7 and 22.7% of the total variance respectively, is shown in Fig. 2A. The first axis is mainly influenced by *G*, HFN and Weak 12min and the second axis by the breadmaking performances (dough score and loaf volume) and ferulic acid (FA) content. Both axes are influenced by the other parameters. This projection obviously shows correlations already observed in Table 5, and easily explains the positive correlations between the protein content and the rheograph data (*G* and *W*) and the negative correlations between these three parameters and the firmograph data (Weak 12 min). After projection in the same plane of the different flours (Fig. 2B)

it clearly appears that the flours harvested in 2002 are almost all in the top right quadrant of the plane, whereas those harvested in 2003 are almost all in the bottom left quadrant. This is particularly true for the varieties AP, AZ and CR. This could be explained by an increase in the protein content (which results in an increase in *G* and *W* and a decrease in Weak 12min) on the one hand and by a decrease in the PUFA content on the other hand (Tables 1 and 2).

**Principal component analysis on biosector data: oxygen and consistency data**

Oxygen consumption data (four parameters) and consistency data (four parameters) obtained from



**Figure 2.** PCA on biosector oxygen and consistency results (mean values): A, projection of variables; B, projection of wheat varieties.

the bioreactor were used as variables in the second PCA. The projection of these variables on the plane defined by the first two axes of PCA, which accounted for ~85% of the total variance (62.4 and 22.2% respectively), is shown in Fig. 3A. The first axis is mainly influenced by the oxygen data and  $C_{2,1}$ , whereas the second axis is mainly influenced by the dough weakening and  $C_{60}$ . This projection shows the positive correlation between total  $O_2$ ,  $V_1O_2$  and  $V_{24}O_2$  previously observed<sup>18</sup> as well as between these parameters and  $C_{2,1}$  (Table 8).

The projection in the same plane of the different flours (Fig. 3B) shows, for flours from the same wheat variety harvested in 2002 and 2003 (AP, AZ, OR and SH), a shift to the top right quadrant of the plane for year 2002 compared with year 2003. This could be explained for the 2003 varieties by the lower oxygen uptake, related to the lower PLFA content, on the one hand and by the lower dough weakening and higher  $C_{60}$ , related to the higher protein content, on the other hand (Table 2).

Thus the wheat flours of our samples in 2002 and 2003 exhibited a similar behaviour for both PCAs, with a clear separation of the two years. Therefore the oxygen consumption and consistency characteristics obtained from our instrumented mixing bioreactor gave valuable data for discrimination among varieties differing in biochemical and rheological characteristics. In addition, the discrimination obtained is equivalent to that obtained with more classical characteristics.

## CONCLUSIONS

Using an instrumented mixing bioreactor developed in our laboratory, we measured the oxygen consumption of the dough and the evolution of its consistency during mixing. Correlations between biochemical characteristics of the wheat flour, rheograph data, firmograph data and oxygen data on the one hand and consistency parameters on the other hand were studied.

We showed that oxygen curves and associated consistency curves measured by means of our instrumented mixing bioreactor could constitute valuable complementary data to rheological data for the characterisation of baking flours.

Moreover, this apparatus allows us to follow the simultaneous effect of the addition of different ingredients (enzymes, substrates or inhibitors) to the dough recipe on both the oxygen uptake (measurement of the intensity of redox reactions) and the consistency during dough mixing.

In addition, a new pilot mixer is now in development in our laboratory. This instrument which gives similar data to the former apparatus (oxygen uptake and consistency characteristics), will be able to handle higher quantities (between 1.5 and 5 kg) of dough under hydration conditions commonly used in breadmaking and therefore will have an energy

input equivalent to that used in industrial mixers. The comparison of data obtained by both apparatus on the same flour will probably be of great interest.

## REFERENCES

- Nicolaï J and Dupron R, Lipoxygenase and some related enzymes in breadmaking, in *Lipid in Great Technology*, ed. by Hurren PJ, Academic Press, London, pp. 213–216 (1983).
- Grosch W, Rancid systems in dough, in *Chemistry and Physics of Baking: New Materials, Processes and Products*, ed. by Hamford MV, Foster P and Galfard T, Royal Society of Chemistry, London, pp. 155–168 (1986).
- Tilley KA, Benjamin RE, Ragooyena KE, Okei-Kotter MM, Prakash O and Kwon H, Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function, *J Agric Food Chem* 49:2627–2632 (2001).
- Piquero-Raposo MC and Rouau X, Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase. Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans, *Cereal Chem* 78:259–263 (2000).
- Nakano H and Marikavalar HU, Oxidative gelation of wheat flour pentosans: a new type of cross-linking polymers, *Cereal Food Flour* 23:374–376 (1978).
- Hoseney RC, Kao H, Fushion DM and Sillau JS, Micrograph studies. IV. The mechanism by which lipoxygenase increases mixing tolerance, *Cereal Chem* 57:143–146 (1981).
- Kiefer R, Weier H, Henderson MH and Graveland A, Correlation of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale, *J Cereal Sci* 27:53–60 (1988).
- Wollich J and Frey CN, Dough oxidation and baking studies. VII. The role of oxygen in dough mixing, *Cereal Chem* 24:436–448 (1947).
- Dobrowczyk R, Adding to the mix, *New Food* 1:16–18 (2005).
- Ryznar A, Colbay F, Niron S, Le Arnaud F, Bournaud A, Poitou A, et al., Mechanical factors of importance in the oxygen consumption of ungerminated and germinated wheat flours during dough mixing, in *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing*, ed. by Courtin CM, Verwer RW and Delcour JA, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, pp. 383–399 (2003).
- Baker JC and Wise MD, Mixing doughs in vacuum in the presence of various gases, *Cereal Chem* 16:317–333 (1937).
- Morton PL, Dough development for breadmaking under controlled atmospheres, *J Cereal Sci* 4:333–344 (1966).
- Smith DE and Andrews JS, The uptake of oxygen by flour dough, *Cereal Chem* 14:323–326 (1937).
- Galfard T, Oxygen consumption of aqueous suspensions of wheat wholemeal, bran and germ: involvement of lipase and lipoxygenase, *J Cereal Sci* 4:53–59 (1966).
- Mann DL and Morrison WR, Changes in wheat lipids during mixing and resting flour water doughs, *J Sci Food Agric* 25:1109–1119 (1974).
- Arévalo V, Davidou S, Dupron R, Potaï J and Nicolaï J, Continuous measurement of oxygen consumption during mixing of ungerminated wheat flour dough, *Sci Alim* 20:221–226 (2000).
- Arévalo V, Castillo P, García R, Eskinasy L, Potaï J and Nicolaï J, Effects of glucose oxidase or lipase addition on dough consistency and oxygen consumption during mixing of ungerminated flour dough, *Sci Alim* 20:441–455 (2000).
- Dalcros JF, Eskinasy L, Bournaud A, Davidou S, Potaï C, Potaï J, et al., Effect of mixing conditions on the behaviour of lipoxygenase, peroxidase and catalase in wheat flour doughs, *Cereal Chem* 78:85–93 (2000).
- Castillo P, Joliet S, Potaï J, Raut P-L and Nicolaï J, Effect of exogenous lipase on dough lipids during mixing of wheat flours, *Cereal Chem* 78:595–601 (2000).
- Payton S, Aboumeh J, Azzouf-C and Rouau X, Enzymatic oxidative treatments of wheat bran lysate: effects on fungal



L. Leveau *et al.*

- acid composition and mechanical properties. *J Agric Food Chem* **49**:4664–4669 (2001).
21. Vignard C, Rakotonirainy L, Folgaridas A, Pottier J and Nicolas J. Separation and identification by gel filtration and HPLC-LUV or HPLC-ECB of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. *J Chromatogr A* **1031**:123–133 (2004).
  22. AFNOR, *Produits Agricoles Alimentaires. Directives Générales pour le Dessin de l'Étiquette avec Mentions relatives à la Méthode de Contrôle*. NF V03-050 (1970).
  23. AFNOR, *Ris Tendre, Seigle et Laine Fines, Riz Dur et Laine Seconde – Détermination de l'Humidité de l'Étalon*. NF V03-T03 (NF ISO 3093) (2004).
  24. AFNOR, *Détermination des Caractéristiques Rhéologiques au moyen de l'Autographe*. NF V03-717-4 (2001).
  25. AFNOR, *Détermination de l'Absorption d'Eau et de Caractéristiques Rhéologiques au moyen de l'Autographe*. NF V03-717-1 (1998).
  26. AFNOR, *Essai de Penétration de Type Pain Caramel Français*. NF V03-716 (2002).
  27. *Statgraphics Plus 3.1 for Windows*. Statpoint Inc. Herndon, Virginia, USA (2001).
  28. Li W, Hollofer SS and Schofield JD. Glutathione and related thiol compounds. 1. Glutathione and related thiol compounds in flour. *J Cereal Sci* **39**:205–212 (2004).
  29. Hosmer BC. *Principles of Cereal Science and Technology* [2nd edn]. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (1984).
  30. Don C, Lichtenhan WJ, Nijjer J, van Vliet T and Hamer RJ. The effect of mixing on glutenin particle properties: aggregation factors that affect gluten function in dough. *J Cereal Sci* **41**:69–85 (2005).

---

## Liste des publications

### REVUES A COMITE DE LECTURE :

Levavasseur, L. ; Rakotozafy, L. ; Manceau, E. ; Louarme, L. ; Robert, H. ; Baret, J.-L. ; Potus, J. and Nicolas J. (2006). **Discrimination of wheat varieties by simultaneous measurements of oxygen consumption and consistency of flour dough during mixing.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86** (11): 1688-1698.

### COMMUNICATION ORALE A DES CONGRES :

Levavasseur, L. ; Rakotozafy, L. ; Jeanneau, A. ; Georis, J. ; Robert, H. ; Genot, B. ; Rouillé, J. ; Bloch, G. ; Baret, J-L.; Arnaut, F. ; Potus, J. and Nicolas, J. 2005. **Laccase effects on dough characteristics.** Communication orale, *4<sup>th</sup> European Young Cereal Scientist and Technologist Workshop*, June 29-30 - July 1, 2005, BOKU, Heiligenstadt, Vienna, Austria.

### POSTERS :

Levavasseur, L. ; Davidou, S. ; Rakotozafy, L. ; Potus J. et Nicolas J. 2006. **Mesure de la prise de force de la pâte au cours du pétrissage : comparaison des données obtenues par 2 pétrins.** Poster présenté au congrés *Chimiométrie 2006*, 30 novembre - 1 décembre, ENSCP, Paris

Levavasseur, L. ;Rakotozafy, L. ; Sommier, A. ; Moulin, G. ; Lanchas, S. ; Rouillé, J. ; Georis, J. ; Potus J. and Nicolas J. 2006. **Comparison of the oxygen consumption of wheat flour dough recorded by two instrumented kneaders using multivariate statistical analysis.** Poster présenté au 13th World Congress of Food Science and Technology, Food is Life, *IUFOST 2006*, 17-21 septembre 2006, Nantes, France.

Levavasseur, L. ; Rakotozafy, L. ; Sommier, A. ; Baret, J-L. ; Arnaut, F. ; Potus, J. et Nicolas, J. 2005. **Mesure de la consommation d'oxygène et des échanges thermiques qui se produisent au cours du pétrissage au moyen d'un pétrin pilote instrumenté. Utilisation de la méthodologie des plans d'expériences.** Poster présenté au congrés de la *Chimiométrie 2005*, 30 novembre - 1 décembre, Villeneuve-d'Ascq.

Levavasseur, L. ; Rakotozafy, L. ; Manceau, E. ; Louarme, L. ; Robert, H. ; Baret, J-L. ; Potus, J. and Nicolas, J. 2005. **Discrimination of wheat varieties by simultaneous measurements of oxygen consumption and consistency curve of flour dough during mixing.** Poster présenté au *4th European Symposium on Enzymes in Grain Processing, ESEGP-4*, Nantes, 6-8 Juin, 2005.

---

## Liste des publications

---

### Résumé :

Le pétrissage des pâtes constitue une étape clé en panification qui conduit au développement des réseaux de gluten et d'arabinoxylanes. Lors du pétrissage, les réactions d'oxydation, pour la plupart enzymatiques, participent à l'acquisition des propriétés viscoélastiques de la pâte et contribuent à la qualité du produit final. Afin de mesurer et caractériser les réactions d'oxydations au sein de la pâte, l'objectif de ce travail de thèse est la mise au point d'un pétrin pilote, le sitoxygraphe, instrumenté pour la mesure directe de la consommation et des vitesses de consommation d'oxygène et de l'évolution du couple s'exerçant sur le bras mobile du pétrin. Ces mesures ont permis d'étudier l'influence de la composition biochimique des farines sur les consommations d'oxygène et sur les paramètres de couple, confirmant l'importance du système lipoxygénase dans les premiers instants de pétrissage ainsi que la probable participation de réactions secondaires. Les corrélations entre les données oxygène et les paramètres de couple ainsi qu'entre les paramètres de couple du sitoxygraphe et des données rhéologiques ont mis en évidence la contribution des réactions d'oxydation dans l'acquisition des propriétés rhéologiques de la pâte. Quelques effets d'améliorants connus ont également été mesurés. Enfin, après avoir sélectionné deux laccases (polyphénoloxydases) potentiellement intéressantes en panification, leurs effets au cours du pétrissage ont été étudiés mettant en évidence un effet positif sur la consommation d'oxygène et négatif sur les paramètres de couple (probable suroxydation). L'oxydation de composés endogènes par ces enzymes via un médiateur d'oxydation constitue une voie intéressante.

Mots-clés : acides gras polyinsaturés ; améliorants ; laccase ; lipoxygénase ; mesure de couple ; mesure de la consommation d'oxygène ; oxydoréduction ; pâte ; pétrissage ; propriétés rhéologiques ; système médiateur d'oxydation ; variétés de blé.

### Abstract :

Wheat flour dough mixing is a key step in the breadmaking process leading to the formation of macromolecular networks (gluten, arabinoxylans). During mixing, the enzymatic oxidation reactions play an important role in the acquisition of the rheological properties of the dough. For that purpose, the aim of this work was to develop the instrumentation of pilot kneader in order to measure the oxygen consumption and the instant rate of oxygen uptake during mixing and the torque applied on the blade. These measures were used to study the influence of the biochemical composition of the flour, confirming that the lipoxygenase system activity was preponderant during the initial phase of mixing. The correlations between oxygen data and torque parameters, and between torque parameters and rheological data showed that oxidation phenomena are linked to the acquisition of rheological properties of the dough. The effects of common used improvers were measured. The possibility to use laccase, a polyphenoloxidase, was also studied. First, two promising enzymes were selected and their effect during mixing were measured (positive effect on the oxygen consumption, negative effect on the torque parameters). Then, the use of laccase mediating systems for the oxidation of endogenous compounds was explored.

Key word : polyunsaturated fatty acids; bread improvers; laccase; lipoxygenase; torque measurement; oxygen consumption; oxidoreduction; dough; mixing; rheological properties; laccase mediating system; wheat varieties.

---