Communications scientifiques & technologiques

Composition lipidique et protéique des pâtes et de la liqueur de pâte. Influences de l'ajout de lipases[1]

Stéphane NÉRON[2], Émilie DUQUENNE[2], Mahammed ZIDOUR[2], Rebeca GARCIA[2], Jacques POTUS[2], Jacques NICOLAS[2]

Introduction

La liqueur de pâte

La liqueur de pâte ou *dough liquor* est la phase liquide hydrosoluble de la pâte extraite par ultracentrifugation (**Figure 1**). Selon BAKER et MIZE (1946), elle contient le film liquide qui entoure les alvéoles gazeux de la pâte et sa composition influence la rétention gazeuse du pâton et l'alvéolage de la mie de pain. BAKER *et al.* (1946), MacRITCHIE (1976), SAHI (1994 et 2003) puis PRIMO-MARTIN *et al.* (2006) précisent que la liqueur de pâte est constituée de lipides, de protéines hydrosolubles, d'oses et d'osides.

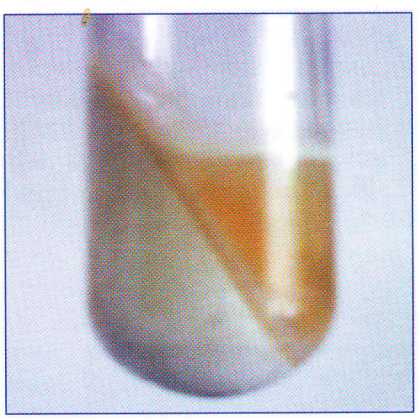


Figure 1. **La liqueur de pâte obtenue par ultracentrifugation.**

Parmi les lipides (**Encadré 1**), les résultats obtenus par chromatographie couche mince (CCM) montrent que les glycolipides (GL) majoritaires sont les digalactosyl-diacylglycérols (DGDG) et les digalactosyl-monoacylglycérols (DGMG) tandis que les phospholipides retrouvés sont identifiés comme la phosphatidyl-choline (PC) et la lyso-phosphatidyl-choline (LPC) par comparaison des *Rf* avec des étalons correspondants. Outre ces lipides polaires, cette équipe montre en CCM, la présence de triacylglycérols (TAG) et de monoacylglycérols (MAG).

Parmi les protéines (**Encadré 2**), les auteurs cités ci-dessus retrouvent, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide après extraction en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), des albumines, des globulines et des traces de gliadines et gluténines.

[1] D'après 2 posters présentés aux 61es Journées Techniques des Industries Céréalières – Octobre 2010 :

Étude de la composition lipidique de la liqueur de pâte
Mahammed ZIDOUR, Stéphane NÉRON, Émilie DUQUENNE, Jacques POTUS, Jacques NICOLAS

Effet de l'ajout de lipases sur la composition biochimique de la dough liquor
Émilie DUQUENNE, Stéphane NÉRON, Marina PAVÉSI, Mahammed ZIDOUR, Rebeca GARCIA, Jacques POTUS, Jacques NICOLAS

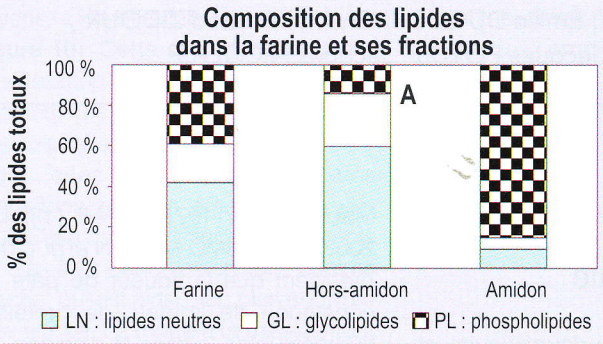
Le deuxième poster a reçu le prix du meilleur poster pour les applications à long terme.

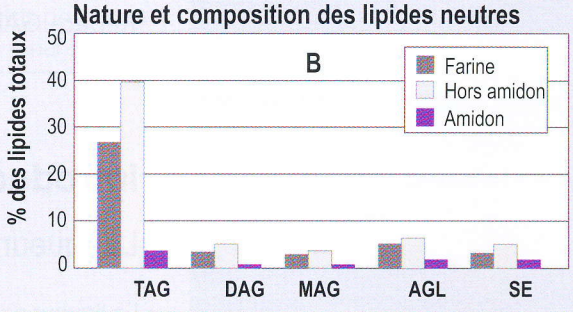
[2] Conservatoire national des arts et métiers
UMR 1145 Ingénierie Procédés Aliments
Laboratoire Industries agro-alimentaires,
Case 306, 292 rue Saint-Martin,
75141 Paris cedex 3.

Encadré 1. Les lipides de la farine

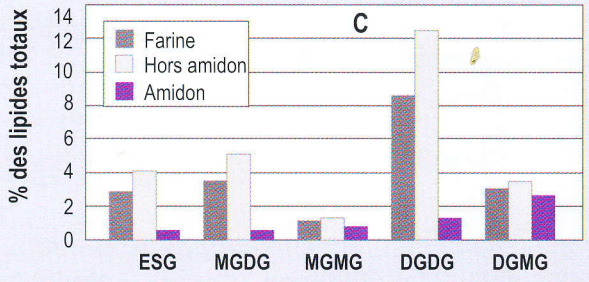
Bien qu'ils soient en faible quantité (0,8 à 1,5 % ms d'après KENT JONES et AMOS, 1967), les lipides de la farine de blé tendre jouent un rôle essentiel lors de l'élaboration du pain. Les lipides de la farine sont constitués de 21 classes de lipides saponifiables séparées en 3 groupes (lipides neutres LN, glycolipides GL, phospholipides PL) dont les proportions varient selon leur localisation à l'intérieur ou à l'extérieur de l'amidon.

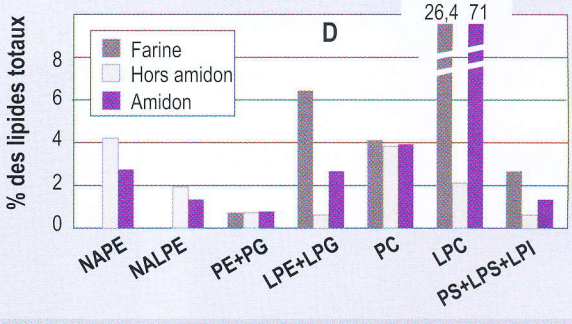
- Les lipides neutres regroupent 5 classes (**Figure B**) dont la plus abondante est celle des triacylglycérols (TAG) constituant 27 % des lipides totaux. Les lipides neutres représentent la fraction la plus abondante hors amidon (60 %) (**Figure A**).
- Les glycolipides, représentant 19,2 % des lipides totaux de la farine (Figure A), regroupent 5 classes de lipides différents dont la fraction majoritaire est celle des digalactosyl-diacylglycérols (DGDG) dans la fraction hors amidon (12,5 %) (**Figure C**) et celle des digalactosyl-monoacylglycérols (DGMG) dans la fraction amidon (2,7 %).
- Les phospholipides regroupent 11 classes (**Figure D**). Ils sont minoritaires parmi les lipides hors amidon (13,9 %), mais constituent 85 % des lipides de l'amidon (Figure A) dont (71 %) de lysophosphatidyl-choline (LPC) (Figure D). Le N-acyl phosphatidyl-éthanolamine (NAPE) est le phospholipide majoritaire hors amidon (4,2 %).





B - Lipides neutres	C - Glycolipides	D - Phospholipides	
TAG : triacylglycérols	ESG : esters de stérol glycosylés	NAPE : N-acyl phosphatidyl éthanolamine	LPG : lysophosphatidyl glycérol
DAG : diacylglycérols	MGDG : monogalactosyl-diacylglycérols	NALPE : N-acyl lysophosphatidyl éthanolamine	PC : phosphatidyl choline
MAG : monoacylglycérols	MGMG : monogalactosyl-monoacylglycérols	PE : phosphatidyl éthanolamine	LPC : lysophosphatidyl choline
AGL : acides gras libres	DGDG : digalactosyl-diacylglycérols	PG : phosphatidyl glycérol	PS : phosphatidyl sérine
SE : esters de stérol	DGMG : digalactosyl-monoacylglycérols	LPE : lysophosphatidyl éthanolamine	LPS : lysophosphatidyl sérine
			LPI : lysophosphatidyl inositol





Composition moyenne (%) en acides gras des lipides du blé, de la farine et de ses fractions hors amidon et amidon.

		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Blé entier	*LT*	20,5	1,5	1,5	14,5	57,5	4
	LN	20,5	*	*	22,5	53,5	3
	LPT	18,5	*	*	14,5	62,5	4
Farine		22,5	1,5	1,5	13,5	58	3
Farine hors amidon	*LT*	18,5	*	1	12,5	63	4,5
	LN	18	*	1,5	14,5	61	4,5
	GL	13	*	1,5	8,5	72,5	4,5
	PL	25	*	1	9,5	61	3
Farine amidon	*LT*	39,5	*	1,5	10,5	48	2,5
	LN	38	*	4,5	16	39,5	3
	GL	21,5	*	3,5	10	61	4,5
	PL	36,5	*	1,5	8,5	50	3

LT : lipides totaux ; LN : lipides neutres ; GL : glycolipides ; PL : phospholipides ; LPT : lipides polaires totaux (GL+LP) ; *Traces

La composition en acides gras est relativement constante, à l'exception des lipides de l'amidon qui se distinguent par leur richesse en acide palmitique ($C_{16:0}$). Dans le blé, la farine et la farine hors amidon, l'acide linoléique ($C_{18:2}$) représente 55 à 60 % des acides gras totaux des lipides neutres, l'acide palmitique ($C_{16:0}$) 18-20 %, l'acide stéarique ($C_{18:0}$) 1-2 %, l'acide oléique ($C_{18:1}$) 15-22 % et l'acide linolénique ($C_{18:3}$) 3-5 %. Enfin, l'acide palmitoléique ($C_{16:1}$) est retrouvé à l'état de traces. La distribution des acides gras a été précisée par ARUNGA et MORRISON (1971). La plupart des acides gras saturés (C_{16} et C_{18}) et monoinsaturés ($C_{18:1}$) sont localisés en position externe (1 et 3) du glycérol, tandis que la position interne (2) est occupée presque uniquement par des acides gras polyinsaturés ($C_{18:2}$ et $C_{18:3}$).

Figures et Tableau adaptés de MORRISON (1983).

Encadré 2. Les protéines de la farine

Les protéines représentent 8 à 13 % de la masse sèche de la farine de blé tendre. Elles se répartissent en 5 classes selon leur solubilité, leur taille et leur fonction biologique.

Classification des protéines de la farine de blé tendre, adapté d'OSBORNE (1907), SHEWRY *et al.* (1986), FEILLET (2000).

Classe	Quantité (% protéines totales)	Solvants	Poids moléculaire (kDa)	Fraction chromatographique*	Fonction biologique
Albumines	15	eau	5 000-30 000	F5	Protéines fonctionnelles
Globulines	5	NaCl 0,5 M	20 000-90 000	F5	
Gliadines	30-40	éthanol	25 000-75 000	F3 + F4	Protéines de structure et réserve
Gluténines solubles	15-20	acide acétique 0,01 M	100 000 et plus	F2	
Gluténines insolubles	25-35	résidu insoluble	1 000 000 et plus	F1	

* après extraction en présence de SDS (MOREL *et al.*, 2002)

Ajout de lipides exogènes

MacRITCHIE et GRAS (1973), SROAN et MacRITCHIE (2008), SROAN *et al.* (2009) ont montré que les volumes des pains obtenus sont très différents selon la nature du lipide ajouté à une farine préalablement délipidée par le chloroforme. L'ajout de lipides polaires totaux (LPT) se traduit par une augmentation du volume du pain, tandis que l'ajout de lipides neutres ou d'acide linoléique libre a un effet négatif sur le volume du pain. L'ajout d'acide palmitique libre est sans effet (SROAN *et al.*, 2009).

L'effet de l'ajout d'acide linoléique semble, à première vue, en contradiction avec les hypothèses attribuant un rôle majeur à l'oxydation de l'acide linoléique catalysée par la lipoxygénase dans la formation du gluten. En effet, cette enzyme agit sur les acides gras polyinsaturés (AGPI) et forme des hydroperoxydes d'acides gras (WHITAKER, 1991). Ces derniers sont susceptibles d'oxyder de nombreux composés comme les pigments caroténoïdes et les groupements thiols des peptides et des protéines (NICOLAS et DRAPRON, 1983). L'oxydation des thiols se traduirait par une augmentation de la réticulation du réseau protéique de la pâte et une augmentation de son élasticité (FRAZIER *et al.*, 1977 ; NICOLAS, 1978). Ainsi, la délipidation d'une farine par le chloroforme n'est probablement pas sans conséquence sur l'activité de la lipoxygénase.

Ajout de lipases exogènes

Les lipases sont autorisées en panification française pour remplacer certains additifs en régularisant les caractéristiques technologiques des pâtes et organoleptiques des pains.

Depuis les travaux précurseurs de DRAPRON et SCLAFANI (1969), de nombreuses recherches sur l'utilisation des lipases exogènes ont été réalisées : OLESEN *et al.* (1994), SI et HANSEN, (1994), SI (1997), POULSEN et BORCH SOE (1997), MARTINEZ-ANAYA et JIMENEZ (1997 et 1998), CASTELLO *et al.* (1998), CASTELLO (1999), NÉRON *et al.* (2004), PRIMO-MARTIN *et al.* (2006), MOAYEDALLAIE *et al.* (2010).

En résumé, il en ressort que les lipases, activées dès le début du pétrissage, modifient, par leur action hydrolytique, la composition des lipides endogènes de la farine. Cette hydrolyse conduit à 2 effets principaux sur le produit fini ; le premier sur le volume du pain et le second sur l'alvéolage de la mie, à travers 2 niveaux d'organisation complémentaires : le réseau de gluten et le film liquide entourant les alvéoles gazeux, qui chacun à leur niveau, ont un effet sur la rétention des gaz.

L'objet de cette étude porte sur l'effet de l'ajout de trois lipases de spécificités présumées différentes sur les compositions lipidique et protéique de la pâte et des liqueurs de pâte correspondantes.

Matériels et méthodes

Matériels

Les liqueurs de pâte ou *dough liquor* (DL) sont isolées par ultracentrifugation (150 000 g, 90 min, 25 °C) de pâtes obtenues après pétrissage à l'aide d'un consistographe double bras (60 tr/min, 16 min, 25 °C). La farine de blé de type 55 a été fournie par les *Moulins Soufflet*. Ces pâtes sont formulées avec 250 g de farine, 56 % d'eau, 1,8 % de sel, et 20 ppm d'enzymes (par rapport à la masse de farine humide).

Trois lipases de spécificité d'action différente sont utilisées. Il s'agit d'enzymes de qualité commerciale fournies pour deux d'entre elles – la Lipopan 50BG et la Lipopan FBG – par *Novozymes Company* (Danemark), et pour une troisième – la Panamore – par *DSM Food Speciality* (Pays-Bas). Selon les fournisseurs :

- la Lipopan 50BG est une enzyme de première génération qui hydrolyse les liaisons ester entre le glycérol et les acides gras placés aux positions 1 et 3 des triacylglycérols, produisant des acides gras libres et des monoacylglycérols.
- la Lipopan FBG est une hydrolase qui agit sur les lipides polaires (phospholipides et galactolipides) mais aussi sur les triacylglycérols de la farine de blé, dont les produits d'hydrolyse sont plus polaires que ceux obtenus par les lipases de première génération, tout en libérant des acides gras.

- la Panamore est une enzyme avec une double action sur les lipides polaires, elle catalyse l'hydrolyse des phospholipides en lysophospholipides et des galactodiglycérides en galactomonoglycérides.

Dans cette étude, 20 ppm (5 mg) d'enzyme sont ajoutés à la pâte selon les doses préconisées par les industriels utilisateurs.

Nous avons généré quatre types de pâtes différentes : une pâte témoin (n = 4) et une pâte contenant chaque lipase (n = 3).

Méthodes

Les lipides et les protéines sont extraits de la farine, des pâtes et des liqueurs de pâte suivant plusieurs méthodes résumées sur la **Figure 2**.

Lipides

Les lipides de la liqueur de pâtes sont extraits de deux façons :

- une extraction rapide, pendant l'ultracentrifugation conduisant à la liqueur de pâte, en procédant à l'ajout de 0,5 mL d'hexane directement dans le tube d'ultracentrifugation ;
- une extraction plus longue à mettre en œuvre, post ultracentrifugation, par un mélange ternaire, méthanol / chloroforme / eau saline selon le protocole proposé par CASTELLO (1999) d'après TSEN *et al.* (1962).

Le choix du solvant d'extraction rapide doit tenir compte de la capacité de résistance aux produits chimiques du tube de centrifugation pour assurer une manipulation en toute sécurité, tout en permettant une extraction sélective des lipides sans dénaturation des autres fractions biochimiques comme les protéines et les glucides. Les contraintes liées aux matériaux et l'application des règles de sécurité ont conduit à faire le choix de l'hexane bien que le benzène, le chloroforme et l'acétone permettent l'extraction de quantités de lipides plus importantes (MacRITCHIE, 1984).

La méthode d'extraction des lipides totaux (lipides libres + liés) la plus courante est celle utilisant un mélange de solvants hydrophobe et hydrophile (chloroforme / méthanol / eau saline, 1/1/1 v/v). L'emploi de ce mélange ternaire, appliqué aux céréales par TSEN *et al.* (1962), est utilisé dans cette étude pour extraire indifféremment les lipides de la farine, des pâtes ou des liqueurs de pâte.

Ces extraits lipidiques hexaniques et chloroformiques ont ensuite été séparés par chromatographie sur couche mince en différentes fractions : lipides polaires totaux (LPT), monoacylglycérols (MAG), diacylglycérols (DAG), acides gras libres (AGL) et triacylglycérols (TAG). La quantification de ces fractions sous forme d'esters méthyliques d'acides gras a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID) (EL AMRANI *et al.*, 2003). L'identification des acides gras est obtenue en comparant leur temps de rétention avec celui d'un standard composé d'un mélange équimassique d'acides gras méthylés ($C_{16:0}$ + $C_{17:0}$ + $C_{18:0}$ + $C_{18:1}$ + $C_{18:2}$ + $C_{18:3}$) à 1 mg.mL^{-1} dans l'heptane. Le $C_{17:0}$ est utilisé comme étalon interne.

Protéines

La méthode utlisée pour l'analyse des protéines de la pâte dérive de celle mise au point pour les protéines de la farine (MOREL *et al.*, 2000). Les protéines des pâtes sont extraites et séparées en fractions solubles et insolubles dans le dodécylsulfate de sodium (SDS) à 1 % dans un tampon phosphate de sodium 0,1 mol.L^{-1} à pH 6,9. Le mélange est agité sur Vortex (20 s), incubé dans une étuve réglée à 60 °C avec agitation sur carrousel pendant 80 minutes exactement. Les tubes sont ensuite centrifugés à 30 000 g pendant 30 minutes à 20 °C. Le surnageant placé dans une seringue est filtré au travers d'une membrane 0,20 µm en PVDF. Le filtrat, stocké à -20 °C, constitue l'extrait de protéines solubles dans le SDS.

Le culot est suspendu de nouveau dans 20 mL du même tampon, agité sur Vortex (20 s) et incubé (60 °C, 30 min) avec agitation sur carrousel. Les tubes sont traités aux ultrasons (7 W, 1 min 30 s) et ensuite centrifugés à 30 000 g pendant 30 minutes à 20 °C. Le surnageant est filtré de la même manière que le précédent. Le filtrat, stocké à -20 °C, constitue l'extrait de protéines insolubles dans le SDS.

Les fractions protéiques extraites sont analysées à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance couplée à un spectrophotomètre à barrette de diodes (HPLC-PDA). L'appareillage est constitué d'une pompe Prostar 230 (Varian), d'un détecteur PDA 330 (Varian), d'un injecteur automatique (module 410) et d'un logiciel Star Varian

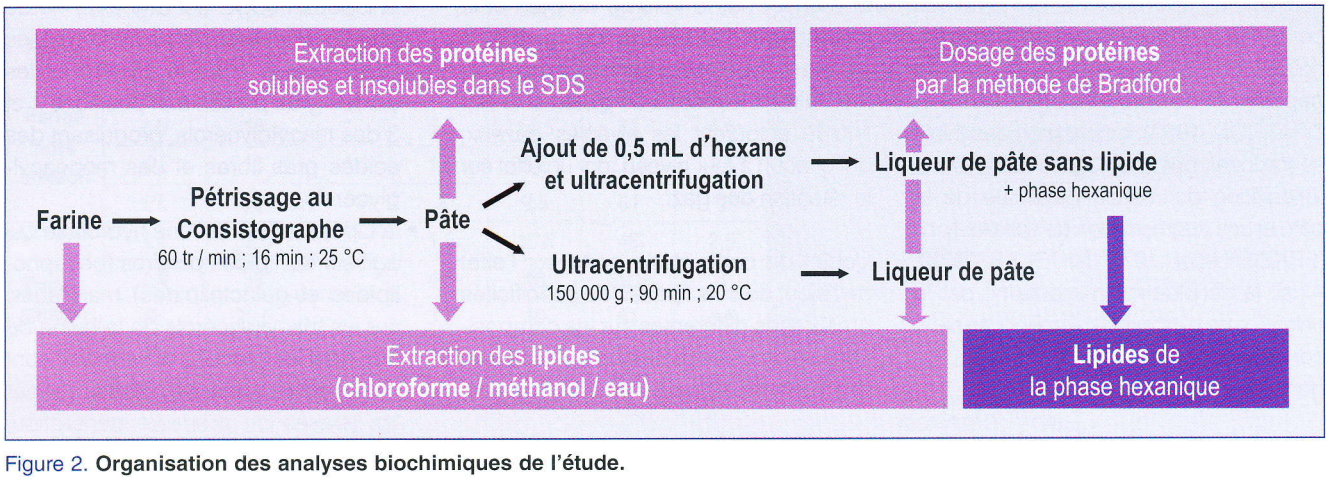


Figure 2. **Organisation des analyses biochimiques de l'étude.**

Workstation. La séparation se fait sur une colonne d'exclusion stérique avec une plage d'exclusion comprise entre 20 et 7 000 kDa. 30 µL d'échantillon sont déposés sur une colonne d'exclusion stérique SEC S4000 (300 mm x 7,5 mm) préalablement équilibrée avec la solution d'élution (tampon phosphate de sodium 0,1 mol.L^{-1}, 0,1 % SDS) filtrée et dégazée sur une membrane de porosité 0,2 µm. La séparation des protéines se fait en mode isocratique à un débit de 0,7 mL.min^{-1} et dure 26 minutes à la température du laboratoire.

Les chromatogrammes obtenus à la longueur d'onde de 214 nm correspondent à l'ensemble des protéines solubles et insolubles. Pour les protéines solubles, cinq fractions sont séparées : F1 correspondant aux hauts polymères gluténiques, F2 aux polymères gluténiques de plus faibles poids moléculaire, F3 et F4 aux gliadines (α, β, γ, ω) et F5 aux albumines et globulines (MOREL *et al.*, 2002) (Encadré 2). L'acquisition et le traitement des chromatogrammes sont réalisés avec les logiciels Star Varian Worstation version 6.2 Interactive Graphics.

Les protéines de la liqueur de pâte sont dosées globalement par le bleu de Coomassie (BRADFORD, 1976) à la longueur d'onde de 595 nm.

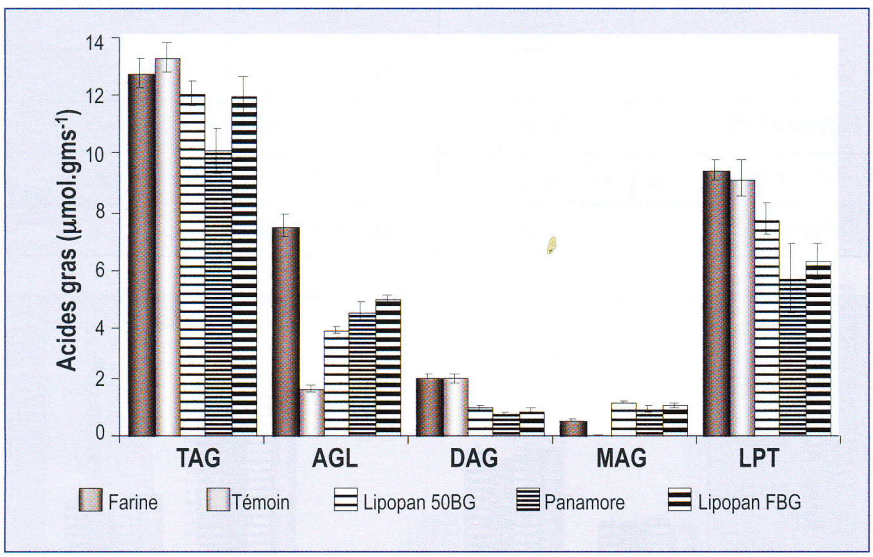


Figure 3. **Distribution des fractions lipidiques de la farine et des pâtes.**

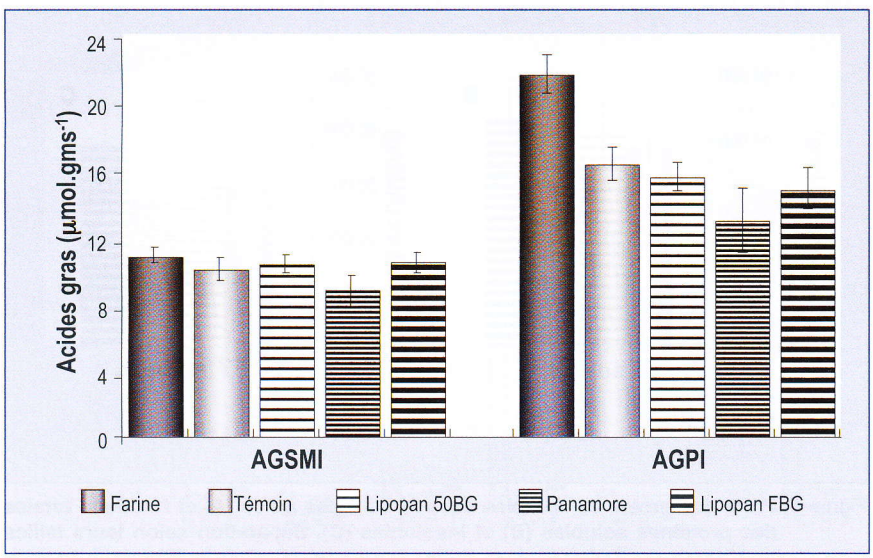


Figure 4. **Distribution des lipides totaux de la farine et des pâtes selon leur contenu en acides gras saturés et monoinsaturés (AGSMI) et en acides gras polyinsaturés (AGPI).**

Résultats et discussions

Les lipides des pâtes

La cartographie lipidique de la farine (**Figure 3**) montre que les TAG constituent la fraction la plus importante (12,9 ± 0,5 µmolAG.gms^{-1}), suivie par les LPT (9,45 ± 0,4 µmolAG.gms^{-1}). Vient ensuite la fraction AGL (7,52 ± 0,4 µmolAG.gms^{-1}), tandis que les DAG et les MAG sont plus faiblement présents (2,13 ± 0,07 et 0,6 ± 0,06 µmolAG.gms^{-1} respectivement).

Aucune différence significative n'est observée entre la farine et la pâte témoin pour l'ensemble des fractions lipidiques à l'exception de la fraction AGL qui passe de 7,52 ± 0,4 à 1,7 ± 0,1 µmolAG.gms^{-1} et de la fraction MAG qui n'est plus quantifiable dans la pâte dans nos conditions analytiques. Cette différence est largement expliquée par l'action de la lipoxygénase endogène de la farine de blé qui oxyde les acides gras polyinsaturés des AGL et MAG en hydroperoxydes d'acides gras (NICOLAS et POTUS, 1994).

Quelles que soient les spécificités d'action des lipases présentées par les fournisseurs, l'ajout de 20 ppm de lipases lors des pétrissages entraîne, par rapport à une pâte témoin, une diminution de la quantité des TAG (de 10 à 25 %) et une diminution des LPT (de 16 à 39 %), ainsi qu'une augmentation des AGL (95 à 150 %). Les Lipopan 50BG et FBG conduisent au même niveau d'hydrolyse des TAG mais la Lipopan FBG hydrolyse davantage les lipides polaires que la 50BG. La Panamore est la lipase dont l'activité hydrolytique est la plus élevée sur les TAG (2,7 µmolAG.gms^{-1} libérés) et les LPT avec une plus forte activité sur ces derniers (3,2 µmolAG.gms^{-1} libérés) (Figure 3). L'ensemble des acides gras libérés par l'hydrolyse des TAG et des LPT ne se retrouvent pas totalement dans la fraction AGL. Dans le cas de la Panamore par exemple, la totalité des acides gras libérés par l'hydrolyse est théoriquement égale à 5,9 µmolAG.gms^{-1} (2,7 µmolAG.gms^{-1} issus des TAG + 3,2 µmolAG.gms^{-1} issus des LPT) alors que l'on constate une augmentation des AGL de seulement 2,7 µmolAG.gms^{-1}.

En classant la totalité des acides gras en 2 familles : les AGSMI (acides gras saturés et monoinsaturés) non oxydables par la lipoxygénase et les AGPI (acides gras polyinsaturés) oxydables (**Figure 4**), on confirme bien la diminution de la quantité des AGPI dans les pâtes, illustrant l'activation du système lipoxygénasique. C'est logiquement en présence de Panamore que l'oxydation des AGPI est la plus forte.

Les protéines des pâtes

Pour la pâte témoin, les résultats obtenus sont conformes à la littérature (TIAFVOON UG-KI MALET, 2005). La **Figure 5A** présente le profil protéique de la fraction soluble dans le SDS. La fraction F4 est majoritaire (40 % des protéines totales), suivie de F2 (25 %), F5 (15 %), F1 (12 %) et F3 (8 %). Les résultats ne montrent pas de différence entre la surface totale des pics des protéines des pâtes supplémentées en Lipopan 50BG ou Lipopan FBG et celle de la pâte témoin. Par contre, une diminution significative de la quantité totale de protéines solubles (**Figure 5B**) dans les pâtes supplémentées en Panamore est observée par rapport aux 3 autres types de pâtes, en particulier pour la fraction F5 des pâtes Panamore. Cette diminution ne se traduit pas par une augmentation des protéines solubles de poids moléculaire plus élevé. Il se pourrait que ces protéines de bas poids moléculaire constitutives de la fraction F5 se soient liées à des protéines solubles de plus haut poids moléculaire sans que ceci se traduise par une augmentation des protéines de haut poids moléculaire en raison des limites de sensibilité de notre méthode d'analyse. Il se pourrait aussi qu'elles se soient liées aux protéines insolubles dans le SDS.

Pour essayer de confirmer cette dernière hypothèse, l'ensemble des fractions insolubles au SDS ont été additionnées (**Figure 5C**). Là encore, la sensibilité de la méthode ne nous permet pas de mettre en évidence une éventuelle augmentation pour la pâte Panamore. Cependant, une augmentation significative des fractions insolubles des pâtes Lipopan par rapport aux pâtes Panamore et témoin est observée.

Les lipides et les protéines de la liqueur de pâte

La quantité de liqueur de pâte obtenue par ultracentrifugation est indépendante de la formulation de la pâte. Dans tous les cas, la quantité de liqueur de pâte représente 20 % de la masse totale de la pâte (**Tableau I**). Nos conditions opératoires ne permettent donc pas d'extraire toute l'eau présente dans la pâte.

Les cartographies lipidiques des liqueurs de pâte réalisées à partir d'extraction par ajout d'hexane avant l'ultracentrifugation et par mélange ternaire [méthanol / chloroforme / eau saline] post centrifugation sont présentées **Figure 6**.

Pour comparer les 2 méthodes d'extraction, nous nous sommes intéressés à la quantité totale de lipides extraits dans le cas du témoin. Cette quantité diffère selon la méthode employée. Elle est de 2,09 µmolAG.gms^{-1} pour l'extraction hexanique et de 2,64 µmolAG.gms^{-1} (soit environ 10 à 12 % des lipides de la pâte témoin) pour l'extraction ternaire (**Tableau II**). En s'inté-

Tableau I. Quantité de liqueur de pâte extraite par ultracentrifugation.

Type de pâte	Pâte (g)	Liqueur de pâte (g)	Liqueur de pâte (%)
Témoin	12,601 ± 0,002	2,532 ± 0,082	20,09
Lipopan FBG	12,601 ± 0,002	2,656 ± 0,145	20,36
Lipopan 50 BG	12,595 ± 0,018	2,506 ± 0,140	19,90
Panamore	12,599 ± 0,012	2,424 ± 0,192	19,24

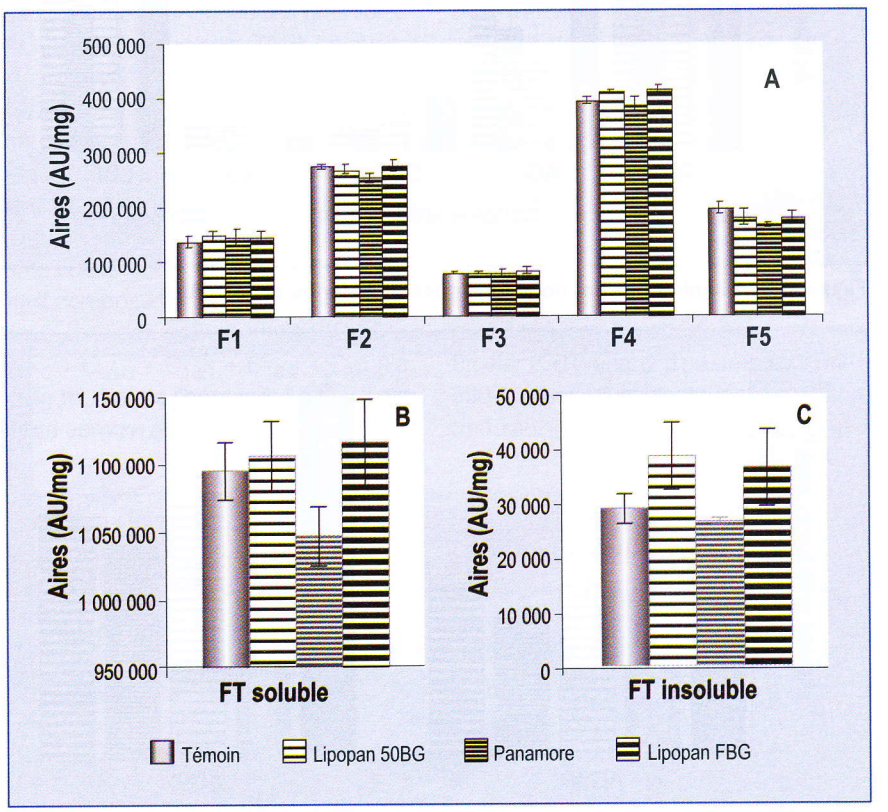


Figure 5. **Profil des protéines solubles dans le SDS des pâtes (A) et fractions totales des protéines solubles (B) et insolubles (C). Séparation selon leurs tailles moléculaires : F1 (gluténines de haut poids moléculaire) ; F2 (gluténines de faible poids moléculaire) ; F3 et F4 (gliadines α, β, γ, ω) ; F5 (albumines et globulines). Fraction totale (FT) : somme des fractions F1 à F5.**

ressant aux différentes fractions lipidiques, on constate que les quantités totales d'acides gras de la fraction TAG sont similaires pour les deux procédés d'extraction (1,39 versus 1,43 µmolAG.gms^{-1}). Par contre, les quantités d'acides gras des fractions AGL et LPT extraites par l'hexane sont inférieures à celles extraites par le mélange ternaire (Tableau II et Figure 6). Les quantités d'acides gras des fractions AGL et LPT des liqueurs de pâte issues des pâtes témoin sont, en moyenne, respectivement 1,8 fois et 1,6 fois moins importantes dans l'extrait hexanique que dans l'extrait chloroformique (Tableau II).

Les quantités d'acides gras des liqueurs de pâte provenant de pâtes supplémentées en lipases, dosées dans les phases hexaniques, sont jusqu'à 1,6 fois plus faibles que celles dosées dans les

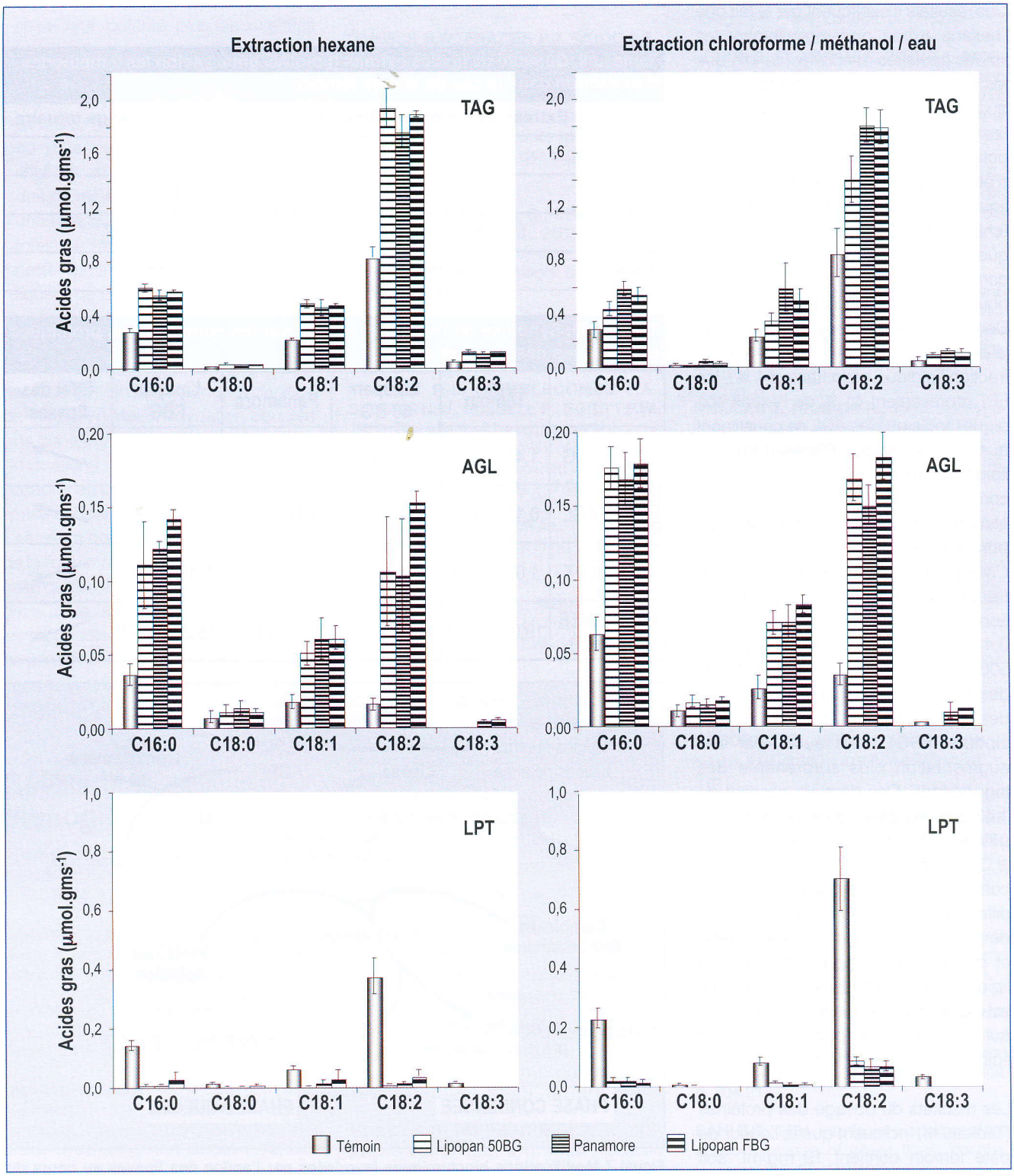


Figure 6. **Composition en acides gras des fractions lipidiques des liqueurs de pâte obtenues par les 2 méthodes d'extraction.**

extraits chloroformiques pour la fraction AGL. Cet écart est du même niveau que celui obtenu pour les pâtes témoin. Pour la fraction LPT, il y a 2,5 fois moins de lipides dans la fraction hexanique que dans l'extrait chloroformique, ce qui constitue une augmentation par rapport à la pâte témoin.

Ces résultats s'expliquent par le fait que l'hexane extrait préférentiellement les lipides apolaires et non liés, tandis que les solvants du mélange ternaire ainsi que l'agitation mécanique permettent l'extraction de davantage de lipides polaires et d'acides gras libres. Afin d'étudier la composition lipidique de la liqueur de pâte, l'extraction ternaire (chloroforme / méthanol / eau), bien que plus longue à mettre en œuvre, est donc la méthode que nous privilégierons pour l'extraction des lipides.

Dans ces conditions opératoires et dans la pâte témoin, les TAG représentent la fraction lipidique majoritaire (54 %), les LPT représentent 41 % de l'extrait lipidique tandis que les AGL ne constituent que 5 % des lipides **(Tableau III)**. Les lipides totaux de la liqueur de pâte sont constitués de 38 % d'acides gras saturés et monoinsaturés et 62 % d'acides gras polyinsaturés.

L'action des lipases (Tableau III) se traduit logiquement par une augmentation des acides gras libres (0,13 à 0,41 µmolAG.gms^{-1} pour la Lipopan 50BG) et une hydrolyse presque totale des lipides polaires totaux (qui passent de 1,08 à 0,10 µmolAG.gms^{-1} pour la Lipopan FBG), mais aussi, par une augmentation plus surprenante des triglycérides. Ces derniers passent de 1,43 µmolAG.gms^{-1} dans la liqueur de pâte témoin à 3,12 µmolAG.gms^{-1} dans la DL Panamore par exemple. Dans nos conditions opératoires, en présence des différentes lipases, d'une part les liqueurs de pâte sont donc enrichies en lipides, et d'autre part la répartition entre les lipides neutres et les lipides polaires est modifiée au détriment de ces derniers qui ne représentent plus que 3 % des lipides de la liqueur de pâte.

Les résultats du dosage des protéines (Tableau III) indiquent que la liqueur de pâte témoin contient 19 mg/mL soit 6,93 mg.gms^{-1} de protéines de la pâte.

L'ajout de lipases provoque une diminution de 9 à 20 % de la quantité de protéines dans les liqueurs de pâte. Ceci est à rapprocher de la diminution de la teneur en protéines solubles dans le SDS de la fraction F5 des pâtes supplémentées en lipases.

Conclusions

La méthode retenue pour l'extraction des lipides de la liqueur de pâte est une extraction par un mélange ternaire méthanol / choroforme / eau.

La fraction lipidique de la liqueur de pâte est constituée majoritairement de

Tableau II. Quantité de lipides extraits (µmolAG.gms^{-1}) selon les 2 méthodes d'extraction dans le cas de la pâte témoin.

	Extraction par ajout d'hexane	Extraction par mélange ternaire
TAG	1,39 ± 0,12	1,43 ± 0,30
AGL	0,077 ± 0,018	0,13 ± 0,04
LPT	0,618 ± 0,089	1,08 ± 0,02
Total	**2,086**	**2,64**

Tableau III. Synthèse de l'effet des lipases sur les compositions protéiques et lipidiques des liqueurs de pâte.

		Témoin	Lipopan 50 BG	Panamore	Lipopan FBG	Effet des lipases
LIPIDES (µmolAG.gms^{-1})	TAG	1,43 ± 0,30	2,29 ± 0,28	3,12 ± 0,33	2,95 ± 0,16	↗
	AGL	0,13 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,41 ± 0,04	0,46 ± 0,03	↗
	LPT	1,08 ± 0,16	0,14 ± 0,16	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,03	↘
PROTÉINES (mg.mL^{-1})		19,00 ± 0,65	17,33 ± 0,50	15,88 ± 0,99	15,27 ± 0,75	↘

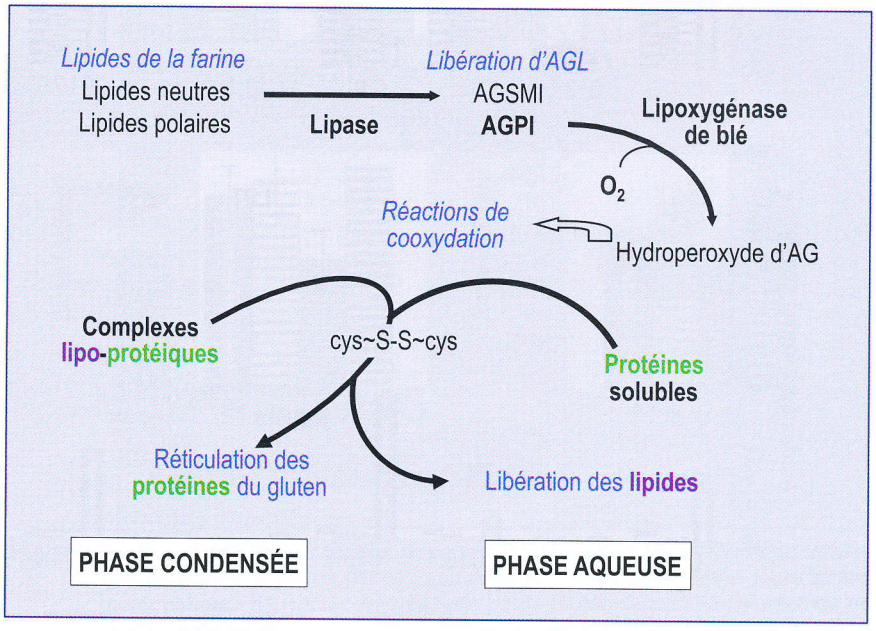


Figure 7. **Modifications biochimiques favorisées par l'action des lipases au cours du pétrissage (d'après DANIELS *et al.*, 1971).**

TAG, puis de LPT et d'une minorité d'AGL.

Dans nos conditions expérimentales, les effets de l'addition de lipases à des pâtes de farines de blé ont pour conséquences :

- une hydrolyse des lipides de la pâte, des triglycérides et préférentiellement des lipides polaires qui peuvent être selon leur polarité plus accessibles aux lipases ;
- l'activation de la lipoxygénase de blé ;
- une diminution significative de la teneur en protéines présentes dans la liqueur de pâte (nous supposons que cet effet est dû à une réticulation accrue des protéines de la pâte) ;
- une forte augmentation de la quantité totale de TAG et AGL, associée à une nette diminution des LPT dans la liqueur de pâte.

Tous ces résultats ne sont pas sans rappeler les observations de DANIELS *et al.* (1971), en présence de lipoxygénase de soja et d'oxygène : activation de la lipoxygénase, oxydation couplée des protéines, libération des lipides. Nous avons modifié leur schéma pour l'adapter au pétrissage en présence de lipase exogène (**Figure 7**).

Ces effets observés sur la composition de la liqueur de pâte, qui pourrait refléter celle du film liquide délimitant les nuclei gazeux de la pâte, se répercutent sur les propriétés tensioactives de la liqueur de pâte (NÉRON *et al.*, 2009), l'alvéolage de la mie et le volume des pains (SROAN et MacRITCHIE, 2009). ■

Références bibliographiques

ARUNGA R.O., MORRISON W.R., 1971. The structural analysis of wheat flour glycerolipids. *J. Sci. Food Agric.*, **6**, 768-776.

BAKER J.C., MIZE M.D., 1946. Gas occlusion during dough mixing of wheat flour. *Cereal Chem.*, **23**, 39-51.

BAKER J.C., PARKER H.K., MIZE M.D., 1946. Supercentrifugation from dough. *Cereal Chem.*, **23**, 539-544.

BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

CASTELLO P., JOLLET S., POTUS J., BARET J.-L., NICOLAS J., 1998. Effect of exogenous lipase on dough lipids during mixing of wheat flour. *Cereal Chem.*, **75**, 595-601.

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.

DANIELS N.W., FRAZIER P.J., WOOD P.S., 1971. Flour lipids and dough development. *Bakers Dig.*, **45(4)**, 20-28.

DRAPRON R., SCLAFANI L., 1969. Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Tech. Agric.*, **18**, 5-16.

EL AMRANI F., FAYOL O., DRAPRON R., POTUS J., NICOLAS J., 2003. Simplified method for the determination of lipolytic activity in low mositure media. *Sci. Aliments*, **23(2)**, 209-211.

FEILLET P., 2000. *Le grain de blé.* INRA éditions. 312 p.

FRAZIER P.J., BRIMBLECOMBE F.A., DANIELS N.W., RUSSELL R., EGGITT P.W., 1977. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of doughs from fat-extracted and reconstituted wheat flours. *J. Sci. Food Agric.*, **28(3)**, 247-254.

KENT JONES D.W., AMOS A.I., 1967. *Modern Cereal Chemistry* (6e éd.). Food Trade Press, London, 730 p.

MARTINEZ-ANAYA M.A., JIMENEZ T., 1997. Rheological properties of enzyme supplemented doughs. *J. Texture Studies*, **28(5)**, 569-583.

MARTINEZ-ANAYA M.A., JIMENEZ T., 1998. Physical properties of enzyme-supplemented doughs and relationship with bread quality parameters. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, **206**, 134-142.

MacRITCHIE F., GRAS P.W., 1973. The role of flour lipids in baking. *Cereal Chem.*, **50**, 292-302.

MacRITCHIE F., 1976. The liquid phase of dough and its role in baking. *Cereal Chem.*, **53**, 318-326.

MacRITCHIE F., 1984. Baking quality of wheat flours. *Adv. Food Res.*, **29**, 201-277.

MOAYEDALLAIE S., MIRZAEI M., PATERSON J., 2010. Bread improvers: comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chem.*, **122(3)**, 495-499.

MOREL M.-H., RELD A., GUILBERT S., 2002. Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules*, **3**, 488-497.

MOREL M.-H., DEHLON P., AUTRAN J.-C., LEYGUE J.-P., BAR-L'HELGOUACH C., 2000. 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**, 685-691.

MORRISON W.R., 1983. Acyl lipids in cereals. *In:* BARNES P.J. (ed.), *Lipids in cereal technology.* Ac. Press, London, p. 11-32.

NÉRON S., EL AMRANI F., POTUS J., NICOLAS J., 2004. Separation and quantification by HPLC-ELSD of the main wheat flour phospholipids during dough mixing in the presence of phospholipases. *J. Chromatogr. A.*, **1047**, 77-83.

NÉRON S., MOULIN G., MEZDOUR S., POTUS J., NICOLAS J., 2009. Effets biochimiques et interfaciaux de la Lipopan FBG au cours du pétrissage au sitoxygraphe. *Industries des Céréales*, **162**, 22-23.

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., DRAPON R., 1983. Lipoxygenase and some related enzymes in bread-making. *In*: BARNES P.J. (ed.), *Lipids in cereal technology.* Ac. Press, London, p. 213-235.

NICOLAS J., POTUS J., 1994. Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydations. Exemples de la lipoxygénase en panification et de la polyphénoloxydase en technologie des fruits et légumes. *Sci. Aliments*, **14(5)**, 627-642.

OLESEN T., QI SI J., DONELYAN V., 1994. *Use of lipase in baking.* Patent PCT/DK93/00274.

OSBORNE T.B., 1907. The proteins of wheat kernel. *In*: *Carnegie Institute of Washington*, 119 p.

PRIMO-MARTIN C., HAMER R.J., DE JONGH H.H.J., 2006. Surface layer properties of dough liquor components: Are they key parameters in gas retention in bread dough? *Food Biophys.*, **1**, 83-93.

POULSEN C., BORCH SØE J., 1997. Effect and functionality of lipases in dough and bread. *In*: ANGELINO S.A.G.F., HAMER R.J., VAN HARTINGSVELDT W., HEIDEKAMP F., VAN DER LUGT J.P. (eds), *Proceedings from the first european symposium on enzymes and grain processing.* Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, p. 204-214.

SAHI S.S., 1994. Interfacial properties of the aqueous phases of wheat flours doughs. *J. Cereal Sci.*, **20**, 119-127.

SAHI S.S., 2003. The interfacial properties of the aqueous phases of full recipe bread doughs. *J. Cereal Sci.*, **37**, 205-214.

SHEWRY P.R., TATHAM A.S., FORDE J., KREIS M., MIFLIN B.J., 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J. Cereal Sci.*, **4,** 97-106.

SI J.Q., HANSEN T.T., 1994. Effect of lipase on bread-making in correlation with their effects on dough rheology and wheat lipids. *Proceedings of the International Symposium of the AACC/ICC/CCOA.*

SI J.Q., 1997. Synergistic effect of enzymes for bread making. *Cereal Foods World*, **42**, 802-807.

SROAN B.S., BEAN S.R., MacRITCHIE F., 2009. Mechanism of gas cell stabilization in bread making. I. The primary gluten–starch matrix. *J. Cereal Sci.*, **49**, 32-40.

SROAN B.S., MacRITCHIE F., 2008. Mechanism of gas cell stabilization in bread making. *In*: CAMPBELL G.M., SCANLON M.G., PYLE D.L. (eds), *Bubbles in food 2. Novelty, health and luxury.* Amer. Assoc. Cereal Chem., Minnesota, p. 299-306.

SROAN B.S., MacRITCHIE F., 2009. Mechanism of gas cell stabilization in bread making. II. The secondary liquid lamellae. *J. Cereal Sci.*, **49**, 41-46.

TIAFVOON UG-KI MALET S., 2005. Effet de la formulation sur les propriétés des pâtes de farine de blé : étude de la structuration des macromolécules et du comportement rhéologique. *Mémoire d'ingénieur,* Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 103 p.

TSEN C.C., LEVI I., HLYNKA I., 1962. A rapid method for the extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem.*, **39**, 195-203.

WHITAKER B.D., 1991. Lipoxygenase. *In*: ROBINSON D.S., ESKIN N.A.M. (eds), *Oxidative enzymes in foods.* Elsevier Applied Sciences, New-York, p. 175-215.

CETRA informatique

EURAGRO Garanti 100 % meunerie

✓ Gestion commerciale et comptabilité dédiées meunerie
✓ Traçabilité amont/aval avec suivi qualité
✓ Gestion des tournées graphiques
✓ Liaisons informatique industrielle
✓ Modules spécifiques meuneries
✓ Outils commerciaux nomades
✓ États FranceAgriMer (nouvelle version)

Partenaire informatique des minoteries depuis 1980.

EURAGRO logiciels intégrés des meuneries et industries des céréales.

CETRA informatique SAS – 16 rue Saint Michel BP 13 – 25800 VALDAHON – FRANCE
Tél. 03 81 56 34 56 – Fax 03 81 56 20 23 - www.cetra.fr - courriel : euragro@cetra.fr

Encadré 2. Les protéines de la farine

Les protéines représentent 8 à 13 % de la masse sèche de la farine de blé tendre. Elles se répartissent en 5 classes selon leur solubilité, leur taille et leur fonction biologique.

Classification des protéines de la farine de blé tendre, adapté d'OSBORNE (1907), SHEWRY *et al.* (1986), FEILLET (2000).

Classe	Quantité (% protéines totales)	Solvants	Poids moléculaire (kDa)	Fraction chromatographique*	Fonction biologique
Albumines	15	eau	5 000-30 000	F5	Protéines fonctionnelles
Globulines	5	NaCl 0,5 M	20 000-90 000	F5	
Gliadines	30-40	éthanol	25 000-75 000	F3 + F4	Protéines de structure et réserve
Gluténines solubles	15-20	acide acétique 0,01 M	100 000 et plus	F2	
Gluténines insolubles	25-35	résidu insoluble	1 000 000 et plus	F1	

* après extraction en présence de SDS (MOREL *et al.*, 2002)

Ajout de lipides exogènes

MacRITCHIE et GRAS (1973), SROAN et MacRITCHIE (2008), SROAN *et al.* (2009) ont montré que les volumes des pains obtenus sont très différents selon la nature du lipide ajouté à une farine préalablement délipidée par le chloroforme. L'ajout de lipides polaires totaux (LPT) se traduit par une augmentation du volume du pain, tandis que l'ajout de lipides neutres ou d'acide linoléique libre a un effet négatif sur le volume du pain. L'ajout d'acide palmitique libre est sans effet (SROAN *et al.*, 2009).

L'effet de l'ajout d'acide linoléique semble, à première vue, en contradiction avec les hypothèses attribuant un rôle majeur à l'oxydation de l'acide linoléique catalysée par la lipoxygénase dans la formation du gluten. En effet, cette enzyme agit sur les acides gras polyinsaturés (AGPI) et forme des hydroperoxydes d'acides gras (WHITAKER, 1991). Ces derniers sont susceptibles d'oxyder de nombreux composés comme les pigments caroténoïdes et les groupements thiols des peptides et des protéines (NICOLAS et DRAPRON, 1983). L'oxydation des thiols se traduirait par une augmentation de la réticulation du réseau protéique de la pâte et une augmentation de son élasticité (FRAZIER *et al.*, 1977 ; NICOLAS, 1978). Ainsi, la délipidation d'une farine par le chloroforme n'est probablement pas sans conséquence sur l'activité de la lipoxygénase.

Ajout de lipases exogènes

Les lipases sont autorisées en panification française pour remplacer certains additifs en régularisant les caractéristiques technologiques des pâtes et organoleptiques des pains.

Depuis les travaux précurseurs de DRAPRON et SCLAFANI (1969), de nombreuses recherches sur l'utilisation des lipases exogènes ont été réalisées : OLESEN *et al.* (1994), SI et HANSEN, (1994), SI (1997), POULSEN et BORCH SOE (1997), MARTINEZ-ANAYA et JIMENEZ (1997 et 1998), CASTELLO *et al.* (1998), CASTELLO (1999), NÉRON *et al.* (2004), PRIMO-MARTIN *et al.* (2006), MOAYEDALLAIE *et al.* (2010).

En résumé, il en ressort que les lipases, activées dès le début du pétrissage, modifient, par leur action hydrolytique, la composition des lipides endogènes de la farine. Cette hydrolyse conduit à 2 effets principaux sur le produit fini ; le premier sur le volume du pain et le second sur l'alvéolage de la mie, à travers 2 niveaux d'organisation complémentaires : le réseau de gluten et le film liquide entourant les alvéoles gazeux, qui chacun à leur niveau, ont un effet sur la rétention des gaz.

L'objet de cette étude porte sur l'effet de l'ajout de trois lipases de spécificités présumées différentes sur les compositions lipidique et protéique de la pâte et des liqueurs de pâte correspondantes.

Matériels et méthodes

Matériels

Les liqueurs de pâte ou *dough liquor* (DL) sont isolées par ultracentrifugation (150 000 g, 90 min, 25 °C) de pâtes obtenues après pétrissage à l'aide d'un consistographe double bras (60 tr/min, 16 min, 25 °C). La farine de blé de type 55 a été fournie par les *Moulins Soufflet*. Ces pâtes sont formulées avec 250 g de farine, 56 % d'eau, 1,8 % de sel, et 20 ppm d'enzymes (par rapport à la masse de farine humide).

Trois lipases de spécificité d'action différente sont utilisées. Il s'agit d'enzymes de qualité commerciale fournies pour deux d'entre elles – la Lipopan 50BG et la Lipopan FBG – par *Novozymes Company* (Danemark), et pour une troisième – la Panamore – par *DSM Food Speciality* (Pays-Bas). Selon les fournisseurs :

- la Lipopan 50BG est une enzyme de première génération qui hydrolyse les liaisons ester entre le glycérol et les acides gras placés aux positions 1 et 3 des triacylglycérols, produisant des acides gras libres et des monoacylglycérols.
- la Lipopan FBG est une hydrolase qui agit sur les lipides polaires (phospholipides et galactolipides) mais aussi sur les triacylglycérols de la farine de blé, dont les produits d'hydrolyse sont plus polaires que ceux obtenus par les lipases de première génération, tout en libérant des acides gras.