

Chapitre 2: Matériels et méthodes

Dans le présent chapitre, une description de la méthodologie et du matériel utilisé sera détaillé pour répondre aux objectifs de cette étude.

I. Matériel végétal :

1. Le blé :

Les graines de trois variétés marocaines de blé ; deux de blé tendre « Kharrouba » et « Kenz » et une de blé dur « Louiza » inscrites au catalogue officiel ont été sujettes aux différentes analyses durant notre travail.

2. L'avoine :

Les graines de trois lignées avancées d'avoine hexaploïdes ont été utilisées.

II. Préparation des mélanges blé /avoine :

Six types de moutures complètes obtenues à l'aide du broyeur de laboratoire « UDY-Cyclone » ont été utilisées dans cette étude :

-Trois moutures de blé issues des deux variétés de blé tendre Kharrouba (BT1) et Kenz (BT2) et de la variété de blé dur « Louiza » (BD)

-Trois moutures d'avoine issue des lignées F11-1(L1), F15-3(L2) et F11-2(L3) Tous les échantillons ont été conditionnés à la même humidité (14%) avant la mouture.

Des mélanges / combinaisons entre les différentes moutures d'avoine et de blé ont été réalisées à des pourcentages d'avoine variables 10%, 30% et 50%.

Deux répétitions ont été faites pour chaque échantillon analysé

III. Evaluation de la qualité du Mélange blé /avoine :

1. Qualité nutritionnelle :

a) Matière sèche :

C'est l'expression de la valeur nutritive d'un aliment après évaporation forcée de toute l'eau qu'il renferme. Elle sert à comparer la valeur nutritive d'aliments ayant des teneurs en eau différentes. (AOAC, 1990)

Mode opératoire :

Il consiste à introduire 3g de mouture obtenue par broyage de grains à 1 mm bien homogénéisée dans un creuset en porcelaine, puis à sécher à l'étuve à T=105°C pendant 24h, puis les sortir et les mettre dans un dessiccateur pour éviter que les échantillons absorbent l'humidité de l'air, et ensuite peser.

Expression des résultats :

Soit :

$$MS\% = ((T+PS) - T) / ((T+PF) - T) * 100$$

T : tare

PS : poids sec

PF : poids frais

b) Analyse du taux des bêta glucanes : (Mc CLEARY, 2006)

Principe :

Les échantillons sont suspendus et hydratés dans une solution de beurre de pH 6,5 et ensuite incubées avec l'enzyme purifiée lichénées et filtrée. Un aliquote du filtrat est hydrolysé à l'achèvement de β -glucosidase purifiée. Le D-glucose produit est dosé en utilisant un glucose oxydase / peroxydase réactif.

Mode opératoire :

Après le broyage avec un tamis de 0.5 mm, on a pesé entre 80-120mg de farine, puis on suit les étapes suivantes :

- Ajouter 0.2ml de l'éthanol aqueux (50%v/v) à la farine dans un tube de 50ml. Ajouter 4ml de tampon phosphate de sodium (20 mM, pH 6,5). Puis agiter au vortex.
- Incuber les échantillons dans un bain marie à 100 °c pendant 60s.
- Agiter puis incuber encore une fois dans un bain marie à 100 °c pendant 2 min.
- Agiter puis incuber encore une fois dans un bain marie à 50 °c pendant 5min.

- Ajouter 0.2ml de lichénase et agiter.
- Incuber dans un bain marie à 50 °c pendant 1h en agitant 4 fois pendant cette incubation.
- Ajouter 5ml de tampon d'acétate de sodium (200 mM, pH 4).
- Agiter, équilibrer les tubes 5 min à 25°C puis centrifuger les pendant 10 min (1000g).
- Filtrer à l'aide de papier wattman.
- Récupérer l'aliquote, ensuite dans 3 tubes on y verse 0.1 ml de ce dernier, puis dans les deux premiers tubes on ajoute 0.1 ml de béta-glucosidase, pour le troisième tube on ajoute 0.1 ml de tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 4,0). En plus de ces 3 tubes un blanc ainsi que 2 autres tubes sont associés, le blanc est composé de 0.1 ml d'eau distillé ainsi que 0.1 ml du tampon, les deux autres sont composés 0.1 ml de D-glucose ainsi que 0.1 ml de tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 4,0).
- Incuber les tubes dans un bain marie à 50 °c pendant 10min.
- Ajouter 3 ml de GOPOD à tous les tubes.
- Incuber les tubes dans un bain marie à 50 °c pendant 20min.
- Enfin lire l'absorbance à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Expression des résultats :

$$\begin{aligned} \beta\text{-glucane (\% w/w)} &= \Delta_A \times F \times (94 \text{ ou } 64) \times \frac{1 \times 100 \times 162}{1000 \times W \times 180} \\ &= \Delta_A \times \frac{F}{W} \times 8,46 \text{ (ou } 5,76) \end{aligned}$$

Où :

Δ_A = Absorbance après le traitement β -glucosidase.

F = facteur de conversion des valeurs d'absorbance en μg de glucose.

= 100(μg de D-glucose) / (absorbance de 100 μg de D-glucose).

94= facteur de correction de volume (0.1 ml sur 9.4 ml analysée pour des échantillons céréales).

64= facteur de correction de volume (0.1 ml sur 6.4 ml analysée pour des produit céréaliers cuits, grillés ou extrudés).

1 /1000=conversion du µg au mg.

100/w= poids sec calculée d'échantillon analysée en mg.

162/180= facteur de conversion à partir de D-glucose libre, tel que déterminé, en anhydro D-glucose, comme se produit dans β-glucane.

NOTE :

Ce calcul peut être simplifié en utilisant le Megazyme **MegaCalc™**, téléchargeable à partir du site Megazyme où le produit apparaît ([www. Megazyme.com](http://www.Megazyme.com)).

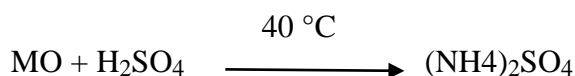
c) Dosage des protéines : (AOAC, 1990)

Les protéines contiennent de l'azote, leurs teneurs dans les aliments sont déterminés par la méthode de Kjeldahl.

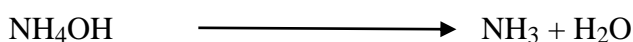
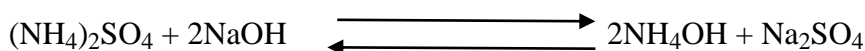
Principe :

Selon la méthode de Kjeldahl, ce dosage s'effectue en trois étapes :

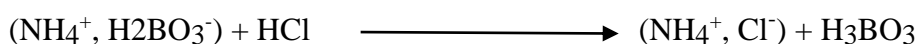
La minéralisation : Elle consiste à transformer l'azote protéique en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique selon la réaction suivante :



La distillation : consiste à distiller l'ammoniac par la vapeur d'eau et le piéger dans une solution d'acide borique. L'ammoniac réagit avec l'acide borique pour former des sels borates d'ammonium. Cette étape s'effectue selon les réactions suivantes :



Titrage : L'ammoniac sous la forme de borates d'ammonium est titré directement à l'aide d'HCl et d'un indicateur :



Réactifs :

- ✓ Catalyseur azoté (sulfate de potassium K_2SO_4 , sulfate de cuivre $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et sélénium en poudre Se).
- ✓ Acide sulfurique.
- ✓ Soude caustique (NaOH 50%).
- ✓ Acide borique.
- ✓ Indicateur TASHIRO (bleu de méthyl + rouge de méthyl).
- ✓ Acide chloridrique HCl 0.1N.

Mode opératoire :

Peser 0,75g d'échantillon broyé et tamisé, dans du papier joseph sec pour éviter que la poudre de l'échantillon ne reste sur la paroi du tube, et l'introduire dans le tube à minéralisation sec.

Ajouter environ 2g de catalyseur (sulfate de potassium K_2SO_4 , sulfate de cuivre $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et sélénium en poudre Se) et des pastilles en verre pour faciliter l'ébullition puis 10ml d'acide sulfurique ($d= 1,84$).

Placer les tubes dans l'appareil de minéralisation et les chauffer doucement pendant une minute ensuite augmenter le chauffage jusqu'à apparition de la couleur verdâtre.

Continuer le chauffage pendant une heure, puis laisser refroidir les tubes.

Ajouter doucement dans le tube environs 100ml d'eau distillée et le placer dans l'appareil de distillation. Ajouter 80ml de soude caustique (NaOH 50%), récupérer la vapeur après avoir placé à la sortie du distillat, un bêcher de 250ml de capacité, contenant l'acide borique à 4%(m/m) additionnée de quelques gouttes de l'indicateur de TASHIRO.

Recueillir 150 ml de distillat est titré avec de HCl 0.1N.

Insérer dans chaque série de tube un blanc qui ne contient pas d'échantillon et le traiter de la même façon que les échantillons.

Expression des résultats :

$$\text{MAT (\%)} = ((V_e - V_b) * 0.875 / (P_e * MS)) * 100$$

Ve : volume de l' HCl 0,1 N ajouté

Vb: volume du blanc

Pe: poids d'échantillon (prise d'essai)

MS%: matière sèche en pourcentage

d) Analyse de la composition minérale:

La composition minérale de l'échantillon se fait par le dosage de chaque élément minéral:

Préparation de l'échantillon:

- Peser 1g d'échantillon finement broyé, tamisé et minéralisé à 500°C pendant une nuit.
- Ajouter 2ml d'HCL plus 2ml d'eau distillée et laisser pendant 2 à 4h
- Filtrer avec l'eau distillée dans une fiole de 100ml et jauger à 100ml.

➤ Dosage de potassium : (Van Rast, 1999)

Principe:

La détermination du potassium permet de connaître les réserves en cet élément dans l'échantillon.

Mode opératoire:

Le dosage de potassium se fait à l'aide d'un appareil flamephotomètre CL378. la teneur en potassium est exprimé en mg/kg(MS) ou mg/100g du poids sec.

Expression des résultats:

$$K^+ = (L * 100) / MS$$

L : lecture en flamophotomètre

MS : matière sèche dans un kg.

➤ Dosage de fer: (Pinta, 1976)

Le dosage de fer se fait à l'aide d'un appareil d'absorption atomique VARIAN 220. la teneur en fer est exprimé en mg/kg (MS) ou mg/100g poids sec.

Expression des résultats:

$$\text{Fe} = (a * 100) / \text{ms}$$

a : l'absorption atomique.

MS : matière sèche dans un kg.

➤ **Dosage de zinc : (Pinta, 1976)**

Le dosage de zinc se fait à l'aide d'un appareil d'absorption atomique VARIAN 220. La teneur en zinc est exprimée en mg/kg(MS)

Expression des résultats:

$$\text{Zn} = (a * 100) / \text{MS}$$

a : l'absorption atomique.

MS: matière sèche dans un kg.

2. Qualité technologique:

a.1- Analyse de la teneur en pigments jaunes :

Principe:

Le principe est l'extraction des pigments bêta-carotènes au n-butanol saturé en eau, à la température ambiante, puis la lecture de la densité optique au spectrophotomètre à 435.8 nm.

La norme marocaine NM08.1. 216 1999) a été adoptée

Mode opératoire:

Peser 8g de la farine et la placer dans un erlenmeyer de 100ml, puis ajouter 40 ml de n-butanol saturé en eau.

Boucher l'erlenmeyer et agiter pendant 1min de façon à obtenir une suspension homogène et laisser reposer à la température ambiante et à l'abri de lumière pendant 18 heures.

Après la fin de cette extraction homogénéiser à nouveau le contenu de l'erlenmeyer, puis filtrer complètement à travers le papier filtre dans un erlenmeyer de 100ml. Pour éviter les pertes de solvant par évaporation placer l'entonnoir sur l'erlenmeyer et le recouvrir avec une boîte de pétri, ensuite prélever un aliquote filtrat clair à l'aide d'une pipette puis remplir la cellule du spectrophotomètre et mesurer la densité optique à 435.8nm.

Utiliser le n-butanol saturé en eau et non filtré pour le réglage comme blanc pour le réglage du spectrophotomètre

Expression des résultats:

La teneur en pigments C exprimés en microgramme caroténoïde par gramme de matière sèche du produit est obtenue par la formule suivante:

$$C = (5 \times A / e \times k) \times (100 / (100 - H)) \\ = 30.1 \times A \times (100 / (100 - H))$$

C : teneur en pigment exprimé en ppm par matière sèche.

A : absorbance à 435.8 nm.

e : chemin optique (largeur interne de la cellule).

K : 0.16632 (absorptivité pour 1mg de pigment dans un litre n-butanol saturé en eau dans une cellule d'épaisseur 1 cm, à une longueur d'onde de 435.8 nm).

H : humidité de l'échantillon en %.

a.2- Analyse des paramètres de couleur par colorimétrie :

La mesure des paramètres de couleur étaient effectuées sur les moutures à l'aide du colorimètre Minolta CR-400 (Konica Minolta, Ramsey, NJ, USA). La clareté « L* » qui représente la

luminance a été alors déterminée pour les différents échantillons. Un blanc d'étalonnage a été utilisé pour calibrer l'équipement avant son utilisation.

a.3- Analyse de la qualité de gluten par SDS :

La force du gluten a été estimée par l'indice de sédimentation au Sodium Dodecyl Sulfate en adoptant la norme marocaine, NM, 08, 1, 217, 1999)

Un indice de sédimentation élevé représente une haute qualité de gluten.

Définition:

L'indice de sédimentation au Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) est le nombre indiquant le volume exprimé en millilitres, du dépôt obtenu, dans des conditions spécifiées, à partir d'une suspension de mouture entière, dans une solution de SDS et de l'acide lactique.

Principe:

La mouture entière préparée à partir des blés et d'avoine, dans des conditions spécifiées de broyage et de tamisage est mise en suspension dans une solution de SDS-acide lactique. Après des temps d'agitations et des temps de repos définis, on lit le volume du dépôt résultant de la sédimentation des particules de farine.

Réactifs:

L'eau utilisée pour la préparation des solutions doit être distillée ou avoir une pureté équivalente (moins de 2 mg/l de matières minérales).

- ✓ Sodium Dodecyl Sulfate : de pureté supérieure à 99 %
- ✓ Acide lactique concentré à 85 %
- ✓ Hydroxyde de sodium (NaOH 0,1 N)
- ✓ Phénophtaléine
- ✓ Préparation de la solution d'acide lactique :

Diluer 100 ml d'acide lactique dans 800 ml d'eau distillée. Porter la solution diluée à ébullition et la maintenir sous reflux durant 6 h. Puis préparation du réactif SDS-acide lactique

Dissoudre 30 g \pm 0, 2 g de SDS dans 970 ml d'eau distillée pour avoir une solution SDS à 3 %. Ajouter 20 ml \pm 0, 1 ml de la solution d'acide lactique 1, 2 N au SDS 3 % et mélanger intimement.

Mode opératoire:

Mettre 6.3 g de farine dans l'éprouvette, puis ajouter 50ml du bromophénol dissous dans l'eau distillé en suite agité manuellement (position horizontale) pendant 5s (12 fois de chaque direction) après:

- 0 min placer l'éprouvette dans l'agitateur et déclencher le chrono.
- 2ème min agité pendant 15 s.
- 4ème min agité pendant 15 s.
- 6ème min agité pendant 15 s et retire les éprouvettes et ajouter 50ml des SDS.
- 0 min agiter pendant 15 s après avoir déclencher le chrono.
- 2ème min agité pendant 6 s.
- 4ème min agiter pendant 6 s puis retirer les éprouvettes et les mettre en position horizontale.
- Après 20min, lire la valeur qui égale le volume de sédimentation.
- Relever la température du liquide de sédimentation et corriger le

Expression des résultats:

Le volume corrigé en millilitre représente l'indice de sédimentation par test SDS sédimentation.

IV. L'analyse statistique :

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne, et ont été soumis à une analyse de la variance et une comparaison multiples de moyennes en utilisant le logiciel SAS (statistical analysis system).