

UNIVERSITE DE MONTPELLIER – MONTPELLIER II
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Master 1 Sciences et Procédés de l'Agro-alimentaire et de l'Environnement

Mention : Biologie, Géosciences, Agroressources, Environnement
Spécialité : BioIngénieries

Evolution et Caractérisation des Relations Arômes-Structure de Riz Aromatiques

par

Maiken THOMSEN

Présenté le 30 juin 2008 devant le Jury de la Commission d'Examen

Membres : Catherine FAUR

Charles GHOMMIDH

Alain LAGAUDE

Rapporteur : Pascale CHALIER

Laboratoire ou entreprise d'accueil :

Centre de Coopération Internationale en
Recherche Agronomique pour le Développement
(CIRAD)

Tuteur laboratoire:

Christian MESTRES
Renaud BOULANGER

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mes tuteurs Messieurs Mestres et Boulanger pour m'avoir conseillé tout au long de la durée de ce stage. Ces conseils ont été indispensables pour mon travail et la rédaction de ce rapport. Les bénéfices personnels acquis, de la part de leurs expériences sont d'une très grande valeur pour ma future vie professionnelle.

Je voudrais également exprime ma gratitude pour Mlle Isabelle Maraval, qui ma soutenu et encouragé durant ces quatre mois de stage.

Merci encore à toute l'équipe de techniciens, Brigitte PONS, Veronique VIDAL, Françoise MATENCIO et Joël GRABULOS, pour l'aide technique et les informations essentiels, qu'ils sont apporté à mon travail.

Je souhait également remercier Chantal CANALES pour la bonne ambiance qu'elle a su créer au deuxième étage, ainsi que pour son soutien logistique.

Finalement, l'ensemble du deuxième étage, de la Maison de la Technologie, mérite un immense merci, pour le bonne humeur et les réponses à tous mes problèmes.

Résumé

Les effets de différentes conditions de stockage (différents usinages, différentes températures, 4 et 20°C) ainsi que des changements de structure du riz sur la libération du 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), de l'hexanal et du nonanal ont été étudiés. L'évolution de ces différents composés d'arômes a été suivie par la méthode SPME.

Durant 3 mois de stockage à 20°C, la teneur en 2AP diminue significativement. Cette diminution est indépendante de l'usinage, en effet, le riz paddy, cargo et blanchi ont perdus les mêmes quantités. Les teneurs en hexanal et nonanal ont augmentées, principalement à cause de l'oxydation des lipides. Cette augmentation est, cependant, plus importante pour les riz sous forme blanchie (6 à 10 fois la teneur initiale) que pour les formes paddy et cargo (2 à 3 fois la teneur initiale).

Au cours de stockage à 4°C, une légère augmentation en 2AP est observée, probablement causée par la méthode utilisée. A cette température, les teneurs en hexanal et nonanal quant à elles, sont stables. Nous avons également déterminé l'acidité grasse qui augmente pour le riz stocké sous forme blanchie à 4 et 20°C mais pas pour les formes cargo et paddy. Cette augmentation est peut-être reliée à la mise en contact des enzymes et de leurs substrats.

Le changement de la structure du riz après broyage indique qu'en broyant le riz, le 2AP se libère plus facilement. Une fois que le riz est broyé, la taille des grains a peu d'influence sur la teneur libérée.

Une gélatinisation de l'amidon de riz favorise la libération du 2AP. Nous avons observé une perte importante en chauffant les échantillons de riz à des températures correspondant à la température de gélatinisation. Contrairement, un échauffement de riz secs n'entraîne aucune perte du 2AP.

Des solutions à différents pH (4, 7 et 10) et de différents sels (NaCl et CaCl₂) ont été ajoutées aux riz. En augmentant le pH, la libération du 2AP augmente. La solution de NaCl n'a aucun effet sur la libération du 2AP, alors que le CaCl₂ à 3 et 4M retient mieux le 2AP que l'eau, malgré une gélatinisation avérée de l'amidon pour la solution de CaCl₂ à 3M. La diminution observée est donc probablement due à un effet secondaire du CaCl₂.

Sommaire

1 INTRODUCTION	2
2 BIBLIOGRAPHIE	3
2.1 LE RIZ.....	3
2.1.1 <i>Structure</i>	3
2.1.2 <i>Composition chimique</i>	3
2.2 AROMES.....	4
2.2.1 <i>Composés d'arôme</i>	4
2.2.2 <i>Formation du 2-acetyl-1-pyrroline</i>	5
2.2.3 <i>Formation des autres composés</i>	5
2.3 INTERACTION ENTRE AROME ET RIZ.....	6
2.3.1 <i>L'amidon</i>	6
2.3.2 <i>Les protéines</i>	6
2.3.3 <i>Les lipides</i>	6
2.4 L'EFFET DE STOCKAGE.....	7
3. MATERIEL ET METHODES	8
3.1 MATERIEL VEGETAL.....	8
3.2 PRODUITS CHIMIQUES.....	8
3.3 METHODES.....	9
3.2.1 <i>Caractérisation de la matière première</i>	9
3.3.2 <i>Adidité grasse</i>	9
3.3.3 <i>SPME (Solid-phase-microextraction)</i>	9
4 RESULTATS ET DISCUSSION	11
4.1 CARACTERISATION DE LA MATIERE PREMIERE.....	11
4.2 MISE AU POINT DES METHODES.....	11
4.2.1 <i>Courbe de calibration</i>	11
4.2.2 <i>Coefficient de partage de 2-acetyl-1-pyrroline dans du riz</i>	12
4.3 ETUDE DE STOCKAGE.....	13
4.3.1 <i>Evolution des composés d'arôme du riz</i>	13
4.3.2 <i>Détermination de l'acidité grasse</i>	16
4.4 BROYAGE.....	17
4.5 TRAITEMENT THERMIQUE.....	18
4.6 TRAITEMENT CHIMIQUE.....	20
5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	21
6 REFERENCES	22

1 Introduction

La production de riz en Camargue a toujours existé. La diversité et la richesse du terroir, ainsi que l'abondance du soleil, permet de produire un riz de qualité. En juin 2000, l'appellation « Riz de Camargue » a été reconnue. A cause de la différence de prix sur les marchés entre riz non-aromatiques et riz aromatiques, la Camargue commence à produire des riz aromatiques.

Les variétés de riz aromatiques se distinguent des riz non-aromatiques par la possession d'un composé d'arôme, le 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) (Buttery *et al.* 1983; Laguerre *et al.* 2007), qui contribue à l'odeur de « pop-corn ». Cette odeur est très appréciée par les consommateurs, mais malheureusement perdu rapidement au cours du stockage. Ce composé a été étudié amplement, depuis son identification par Buttery *et al.* (1982) et des diverses méthodes pour sa quantification ont été développées et améliorées avec le temps. Connaissant une méthode rapide et précise, la SPME (solid-phase microextraction), il est aujourd'hui facile d'évaluer sa présence et sa quantité dans le riz aromatique (Laguerre *et al.* 2007).

On observe généralement une diminution du 2AP au cours du stockage, et les mécanismes spécifiques, qui expliquent la liaison entre le 2AP et les riz, sont, à ce jour, toujours inconnus. De nombreuses études ont été faites, en vue d'optimiser sa rétention dans le riz au cours de stockage (Sirisoontarakul and Noomhorm 2006; Tulyathan *et al.* 2008; Widjaja *et al.* 1996; Yoshihashi *et al.* 2005). Plus généralement, les aspects organoleptiques changent en fonction du stockage et en particulier avec l'oxydation des lipides (Zhang *et al.* 2007) et les changements de texture (Chrastil 1990).

En utilisant la méthode SPME, nous cherchons à trouver des conditions optimales pour le stockage des riz aromatiques, qui limitent ces changements non-désirés. Nous avons étudié le stockage de riz aromatiques, provenant de Camargue, sous différentes conditions, dans le but d'observer l'effet de:

- la variété,
- la température de stockage,
- les traitements post-récolte.

Nous avons également essayé de mieux comprendre les mécanismes responsables de la liaison entre le 2AP et le riz, en regardant sa libération en fonction de différents changements structurel du riz, comme l'effet de:

- la granulométrie des particules de riz,
- l'échauffement des grains de riz, incluant la gélatinisation de l'amidon,
- divers solutions de sel, incluant le CaCl_2 , un sel, dit dégradant,
- la valeur de pH.

Ce rapport va donc présenter ces études mentionnées, effectuées au sein de l'établissement CIRAD (Centre de Coopération en Recherche Agronomique pour le Développement) à Montpellier.

2 Bibliographie

2.1 Le riz

2.1.1 Structure

Le riz (*Oryza sativa L.*) est une céréale qui fait partie de la famille Poaceae. Il est récolté sous sa forme brute, qui consiste en la partie consommable, le caryopse, emballé de ses glumes et glumelles. Après récolte le riz subi différents traitements (Figure 1). L'appellation de ces riz après traitement est : riz cargo et riz blanchi. Le riz paddy, trouvé sous la forme brut, n'a reçu aucun traitement. Il est trouvé dans son état entier, toujours en possession de sa balle. Le riz cargo est décortiqué, et plus généralement appelé riz complet. Le riz blanchi est la forme la plus traité. Les grains sont décortiqués et polis, donc constitués uniquement de leur albumen.

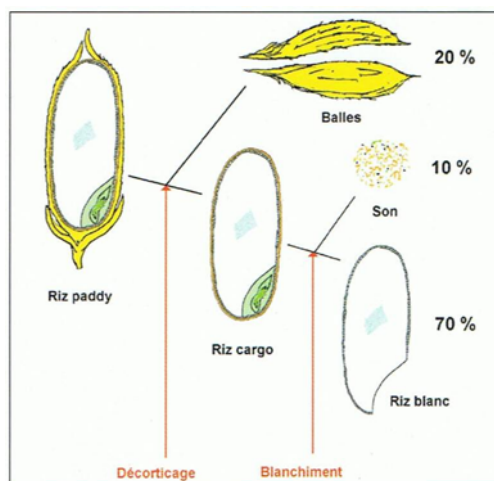


Figure 1: Usinage de riz

2.1.2 Composition chimique

La composition en nutriments des riz dépend des traitements qu'il a subit (Tableau 1).

Tableau 1: Composition des différents riz (Champagne 1972)

Nutriment (% de base sèche)	Traitement		
	<i>Paddy</i>	<i>Cargo</i>	<i>Blanchi</i>
Protéine	5.8-7.7	4.3-18.2	4.5-10.5
Matière grasse	1.5-2.3	1.6-2.8	0.3-0.5
Amidon	53.4	66.4	77.6
Fibre	7.2-10.4	0.6-1.0	0.2-0.5

Le composé le plus important dans le riz est l'amidon. L'amidon se trouve uniquement dans l'albumen du riz, il est constitué par l'amylose et l'amylopectine. La teneur en amylose dans le riz varie considérablement en fonction de la variété du riz. Pour une teneur d'amylose de 0 à 2% le riz est dit gluant. Les caractéristiques sensorielles, comme la texture, la couleur et l'augmentation en volume, dépendent ainsi de la teneur en amylose.

La granulométrie de l'amidon du riz est petite comparée à celle du blé. Le diamètre des grains d'amidon de riz est de 3-8µm. Il est constitué généralement de 14 à 32% d'amylose et sa température de gélatinisation varie de 61 à 78 °C. 38% de l'amidon du riz est sous forme cristalline de type A. La forme cristalline est constitué majoritairement d'amylopectine (Belitz *et al.* 2004).

L'amylose du riz a une structure d'un hélice. La surface est couverte de résidus hydroxylés, donc hydrophile alors que l'intérieur de l'hélice est hydrophobe. Cette structure permet de former des divers complexes entre l'amylose du riz et des petites molécules hydrophobes, comme par exemple les lipides ou les composés d'arôme. La dimension de l'hélice change en fonction de la taille des molécules complexées. Le diamètre interne d'hélice varie entre 1.37-

1.62nm et un tour d'hélice comprend 6 résidus de glucose. L'amylopectine est aussi sous forme d'hélice. Cependant, ce sont des hélices, peu complexés à des petites molécules, comme l'amylose (Belitz *et al.* 2004).

La teneur en matières grasses est plus importante dans les riz paddy et cargo. La distribution des lipides dans les grains n'est pas homogène. Ils se trouvent surtout dans le son et dans le germe, mais une petite proportion se trouve aussi dans l'albumen. L'albumen contient surtout les lipides polaires et il existe un gradient de la surface du grain jusqu'au centre. Les acides gras les plus abondants sont l'acide palmitique (C16:0) oléique (C18:1) et linoléique (C18:2). Les lipides que l'on trouve dans l'albumen sont liés à l'amidon. Les grandes chaînes d'hydrocarbures forment des complexes avec les hélices d'amylose (Belitz *et al.* 2004). D'après Yamada *et al.* (1998) ce sont les lipides saturés que l'on trouve en complexe avec l'amidon, car les doubles liaisons dans les lipides non-saturés empêchent la formation d'un complexe amidon-lipide.

La majorité des protéines se trouvent dans le son (11.3-14.9%), mais une présence est toutefois notable dans la balle (2.0-2.8%) et l'albumen (6.3-7.1%). Dans l'albumen les protéines sont liées à l'amidon. La protéine la plus importante dans le riz est oryzenine. Elle est liée à la fois à l'amylose et à l'amylopectine.

Les liaisons entre les protéines et l'amidon ont une influence importante sur la texture du riz. La formation et dégradation de ces complexes détermine la texture des riz cuites (Chrastil 1990; Teo *et al.* 2000).

2.2 Arômes

2.2.1 Composés d'arôme

Il existe de nombreuses méthodes pour doser les composés d'arôme présents dans le riz. Les premières études qui se sont intéressés aux composés d'arômes dans le riz, ont extraits les composés volatils par distillation suivi d'une extraction par solvants (Tsugita *et al.* 1980; Widjaja *et al.* 1996; Yajima *et al.* 1978; 1979). Des études plus récentes ont utilisé, pour extraire les arômes, des extractions directe par solvants (Tulyathan and Leecharatanaluk 2006; Wongpornchai *et al.* 2004; Yoshihashi 2002; Yoshihashi *et al.* 2005)) et la SPME (solid-phase microextraction) (Grimm *et al.* 2001; Laguerre *et al.* 2007; Tulyathan *et al.* 2008)).

La méthode SPME, mise en œuvre par Grimm *et al.* (2001), est un outil fiable et rapide pour évaluer les composés d'arôme dans le riz. Cette méthode, modifiée par Laguerre *et al.* (2007), a permis de distinguer les riz aromatiques et non-aromatiques.

Le 2-acetyl-1-pyrroline est le composé qualitativement le plus important dans le riz aromatique. Il a été identifié pour la première fois, dans les riz, par Buttery *et al.* (1982), pour ensuite être étudié par de nombreux chercheurs, pour tenter de comprendre son origine (Adams and De Kimpe 2006; Favino *et al.* 1996; Hofmann and Schieberle 1998; Kimpe and Keppens 1996; Kimpe *et al.* 1993), le quantifier dans les riz et autres céréales (Hien *et al.* 2006; Itani *et al.* 2004) et évaluer sa dégradation et sa perte pendant le stockage et la cuisson (Tulyathan and Leecharatanaluk 2006; Widjaja *et al.* 1996; Yoshihashi *et al.* 2005; Yoshihashi *et al.* 2002)

Les composés d'arôme dans le riz cuit de Camargue ont été étudiés par Maraval *et al.* (2008). Un total de 60 composés volatiles ont été identifiés, dont 17 composés ont pu régulièrement être détectés, dans des riz aromatique (Aychade et Fidji) et non-aromatique (Ruille). Les composés contribuant majoritairement à l'arôme du riz aromatique sont ; 2-acetyl-1-pyrroline

(riz cuit), (*E,Z*)-deca-2,4-diène (fruits/fleurs), 2-méthoxy-4-vinylphénol (brulé), 4-vinylphénol (médicale), (*E,E*)-nona-2,4-diène (cacahuète), décanal (fruits/fleurs), hexanal (herbes), vanilin (vanille).

2.2.2 Formation du 2-acetyl-1-pyrroline

Il existe de nombreuses tentatives pour comprendre la formation du 2-acetyl-1-pyrroline. Buttery et al. (1983), ont comme les premiers, émis l'hypothèse que la proline soit le précurseur du 2AP. Ultérieurement, leur hypothèse a été confirmée pour différents matrices. Schieberle (1989) montre, dans une étude sur les pains, que proline est dégradée suivant la voie de Strecker pendant chauffage, en formant le 2-acetyl-1-pyrroline. Romanczyk et Al. (1995) montrent que le 2AP est formé par des microorganismes pendant fermentation des fèves de cacao, en dégradant la proline. Finalement, la biosynthèse de 2AP, a été étudiée par Yoshihashi (2002), qui propose qu'une réaction entre proline et une source de carbone (inconnue à ce jour) forme le 2AP dans les plantes de riz. Un marquage isotopique montre en effet, que la source d'azote est liée à la proline (Figure 2).

De plus, dans la même étude les auteurs ont démontré qu'en faisant pousser une plante de riz dans une solution à forte concentration en proline, entraîne une quantité plus élevée de 2AP dans le riz qu'avec des solutions contenant d'autres acides aminés.

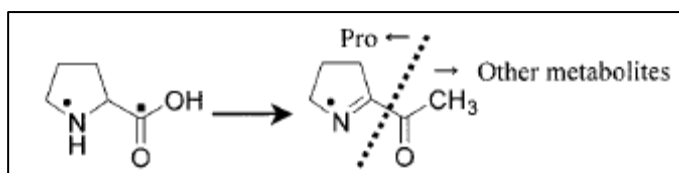


Figure 2: Formation du 2AP par la proline

Malgré les nombreuses études, on ne sait pas encore où le 2AP est synthétisé dans la plante.

2.2.3 Formation des autres composés

Il existe différentes voies réactionnelles pour former les composés d'arômes. Dans le riz la voie la plus importante est l'oxydation des lipides (Tableau 2). L'oxydation des acides gras non-saturés, comme l'acide linoléique et oléique, forme des composés constituant la majorité des arômes dans le riz. Bruechert et al. (1988) ont trouvés que l'oxydation d'acide linoléique, provenant de l'amidon des céréales, forme majoritairement les dérivés 2,4-décadienal et hexanal. Récemment, Maraval et al. (2008) ont émis l'hypothèse que la 2-méthoxy-4-vinylphénol et 4-vinylphénol provenaient de la dégradation d'acides cinnamiques.

Tableau 2: Formation des composés d'arôme et leurs précurseurs

Composé	Voie réactionnelle	Précurseur
2-acetyl-1-pyrroline		Proline
(<i>E,Z</i>)-deca-2,4-diène	Oxydation	Acide linoléique
2-méthoxy-4-vinylphénol		Acide <i>para</i> -coumarique
4-vinylphénol		Acide férulique
(<i>E,E</i>)-nona-2,4-diène	Oxydation	Acide linoléique
Décanal	Oxydation	Acide oléique
Hexanal	Oxydation	Acide linoléique

Lors de la cuisson, les réactions Maillard sont aussi responsables de la formation de composés d'arôme qui donnent notamment des odeurs de cuit et grillé, mais aussi des odeurs amers. Elles produisent également des couleurs marron et noirs, spécifique des aliments cuites.

2.3 Interaction entre arôme et riz

Les arômes sont des petites molécules volatiles, pouvant être liées aux chaînes des acides gras, des protéines ou de l'amidon. Ils peuvent être liés par des interactions covalentes, hydrophobes ou être encapsulés dans des grandes macromolécules.

2.3.1 L'amidon

Il est connu que l'amidon joue un rôle important pour la rétention et le stockage des composés d'arôme. L'interaction exacte entre les arômes et l'amidon n'est à ce jour toujours pas connue, mais un grand nombre d'études sur les aspects structurels des interactions ont été réalisées. Selon Wulff et al. (2005) l'arôme est encapsulé dans les hélices d'amylose. La quantité d'arôme retenue dépend du diamètre de l'hélice et de la taille des composés. Biais et al. (2006) ont proposé que dans un gel d'amylose, l'arôme soit situé entre les hélices d'amylose, et en partie liés à la structure amorphe d'amylose. Les composés qui se trouvent dans la partie amorphe sont considérés comme des composés libres, qui sont faiblement liés à l'amidon.

L'amylopectine est aussi capable de former des complexes avec des composés d'arôme. Arvisenet et al. (2002b) ont fait une étude avec une solution d'amidon gluant, c'est-à-dire sans amylose. Ils ont montré que les composés d'arôme sont bien retenus dans cette structure, mais plus faiblement que dans une solution d'amidon contenant de l'amylose.

La rétention des composés d'arôme est très forte dans les solutions d'amylose. La teneur en arôme est pratiquement stable même après 1 an de stockage (Wulff *et al.* 2005).

Toutefois, la rétention d'arôme dépend de sa concentration. S'il est présent dans la solution d'amidon en petite concentration, il est libéré plus facilement que si l'arôme s'y trouve en forte concentration (Tietz *et al.* 2008).

Il est à noter que, la majorité de ces études ont été réalisées avec des solutions d'amidon ou d'amylose seule, en ajoutant les composés d'arômes (Arvisenet *et al.* 2002a; Arvisenet *et al.* 2002b; Tietz *et al.* 2008; Wulff *et al.* 2005). Ces études ne nous montrent donc pas comment les arômes sont complexés dans un amidon natif présentant une structure cristalline de type A, contrairement aux complexes, de type V, formés à partir de solutions.

2.3.2 Les protéines

Les protéines forment aussi des liaisons avec les composés d'arôme. Ils peuvent être liés soit aux liaisons covalentes, soit par des liaisons hydrophobes. Cependant, le degré de transformation de la protéine, ainsi que la nature de l'arôme, jouent un rôle important sur la puissance de ces liaisons. L'affinité de certaines protéines pour les arômes augmente entre les alcools, les cétones et les aldéhydes (Guichard 2002).

2.3.3 Les lipides

Les lipides sont également des molécules qui assurent la rétention des composés d'arômes. La quantité et l'intensité des liaisons hydrophobes varient selon la nature du lipide ainsi que de la concentration des lipides. L'affinité augmente avec la longueur de la chaîne aliphatique des acides gras et le nombre de doubles liaisons (Guichard 2002). Une étude faite par Giroux et al. 2007 montre ensuite que les arômes hydrophobes dépendent essentiellement de la teneur en lipides, et non de la teneur en protéines dans les émulsions.

2.4 L'effet de stockage

Pendant le stockage différents phénomènes se produisent. L'oxydation des lipides, la dégradation de l'amidon et des protéines et la perte d'arôme sont les réactions les plus communes. Le degré d'altération du riz pendant le stockage dépend de plusieurs facteurs ; la température sous laquelle les riz sont stockés, la présence ou l'absence d'oxygène ainsi que le degré de transformation.

La perte en 2-acetyl-1-pyrroline durant le stockage dépend surtout de la température sous laquelle le riz est stocké. La teneur en 2-acetyl-1-pyrroline diminue lorsque le riz est stocké à température ambiante (25-35°C) alors qu'il est stable à des températures plus basses (5°C) (Tulyathan and Leecharatanaluk 2006; Yoshihashi *et al.* 2005). L'usinage ne semble pas avoir d'effet sur la rétention du 2-acetyl-1-pyrroline. Parmi le riz paddy, cargo et blanchi, les mêmes pertes de 2-acetyl-1-pyrroline ont été observés après pendant 3 mois de stockage (Widjaja *et al.* 1996).

Contrairement au 2-acetyl-1-pyrroline, d'autres composés volatils sont formés pendant le stockage. Il s'agit surtout d'aldéhydes et de cétones qui sont des produits formés par l'oxydation des lipides. Cette formation dépend de la température de stockage, mais aussi du degré d'usinage. Widjaja *et al.* (1996) ont observés une augmentation importante en hexanal, octanal, nonanal et (E)-2-octenal pour le riz stocké à température ambiante. Ces augmentations sont plus importante pour le riz blanchi que pour le riz cargo et paddy.

Dans la même étude, ils ont observés une perte de ces composés lors d'un stockage sous pression réduite. Ceci nous confirme que cette augmentation en aldéhydes est bien causée par oxydation.

Les responsables de l'oxydation de certains lipides sont des isoenzymes lipoxygénases (LOX). Ils sont responsables de l'oxydation des acides gras qui contiennent un système 1-cis, 4-cis-pentadiène, comme les acides linoléique et linoléique (Belitz *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007). L'autooxydation et la photooxydation sont également responsables de l'oxydation des lipides.

Une étude de Zhou *et al.* (2003), a montré que les acides gras qui sont oxydés pendant stockage, sont les lipides qui ne sont pas en complexe avec l'amylose.

Pendant le stockage, la composition chimique du riz change. Sung *et al.* (2008) ont observé une diminution de la teneur en protéines et en lipides suite à 12 mois de stockage à température ambiante. La teneur totale en amidon reste stable durant toute cette période. Cette observation est, cependant, en contraste avec une étude de Chrastil (1990), qui n'a trouvé aucun changement pour la teneur totale en protéine pour des riz stockée pendant 12 mois.

De plus, dans la même étude, Chrastil (1990) a observé une augmentation des interactions entre oryzenine et amidon ainsi qu'une la formation de ponts de disulphide entre les molécules de cystine qui se trouvent dans l'oryzenine. Ces augmentations sont plus fortes pendant stockage à haute température. La texture après cuisson devient alors plus dure.

Concernant la teneur en amylose, il existe encore des résultats contradictoires. Chrastil (1990) a observé une diminution de sa teneur au cours de stockage alors que Teo *et al.* (2000) ne voient aucun changement. La différence entre ces observations est probablement due au temps de stockage. Teo *et al.* (2000) ont stocké le riz durant une période de 14 semaines, alors que Chrastil (1990) les a stockés pendant 12 mois.

Le stockage modifie par ailleurs le comportement à l'usinage du riz (augmentation du rendement) et à la cuisson. La capacité de gonflement augmente et la fermeté diminue (Siebenmorgen and Meullenet 2004).

3. Matériel et Méthodes

3.1 Matériel végétal

Trois variétés de riz récoltées en Camargue en octobre 2007 ont été utilisées pour la réalisation de nos différentes études : Aychade, Fidji et Giano.

- L'évaluation des composés d'arôme au cours du stockage a été réalisée sur des riz à différents stades de transformation (paddy, cargo et blanchi) et stockés à deux températures différentes, 4 et 20°C. Les échantillons ont été conservés dans des bocaux en verre couverts d'un tissu pour permettre un échange d'air. Les formes et les conditions de stockage sont récapitulées dans le Tableau 3. Chaque mois un prélèvement du riz a été effectué puis analysé.

Tableau 3: Conditions de stockage des riz de Camargue

Variété	Température de stockage	Traitement	Appellation
Aychade	4	Aucune	Paddy
		Décortilage	Cargo
		Blanchiment	Blanchi
	20	Aucune	Paddy
		Décortilage	Cargo
		Blanchiment	Blanchi
Fidji	4	Aucune	Paddy
		Décortilage	Cargo
		Blanchiment	Blanchi
	20	Aucune	Paddy
		Décortilage	Cargo
		Blanchiment	Blanchi
Giano	4	Aucune	Paddy
		Décortilage	Cargo
		Blanchiment	Blanchi
	20	Aucune	Paddy
		Décortilage	Cargo
		Blanchiment	Blanchi

- Pour l'étude des liaisons entre la structure du riz et le 2AP, les riz ont subis un blanchiment, pour ensuite être stockés à 4°C dans des bouteilles en verre bouchonnées. (Blue-cap)

Le décortilage a été effectué avec un décortiqueur *Satake*. Les grains paddy, riz brut de récolte, subissent un passage entre deux rouleaux en caoutchouc afin d'enlever les balles, puis celles-ci sont séparées des grains par aspiration.

Le blanchiment a été réalisé par un Blanchisseur à cône abrasif (*Colombini Sergio & C. Mod. G. 150*) qui sépare le son des riz cargos par friction entre les riz et un cône en pierre.

Après les traitements les riz ont été triés afin d'enlever les grains abimés dans nos échantillons.

3.2 Produits chimiques

Une solution de 2-acetyl-1-pyrroline, synthétisée par l'école de Chimie de Montpellier, à une concentration de 0.053mg/ml a été utilisée pour réaliser une courbe de calibration.

2-acétylpyrrole 99%, acheté à Sigma-Aldrich.

3.3 Méthodes

3.2.1 Caractérisation de la matière première

La caractérisation de la matière première a été réalisée en mesurant la teneur en eau, en protéines, en amylose, ainsi que par la détermination de la température de gélatinisation.

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. La teneur en amylose (Mestres *et al.* 1996) et la température de gélatinisation ont été mesurées par DSC (Differential scanning calorimetry) (Mestres and Rouau 1997). La matière sèche a été déterminée par dessiccation à 130°C pendant 2 heures.

3.3.2 Adidité grasse

L'acidité grasse a été mesurée par titration avec NaOH. Environ 5 g de riz broyé finement (0.5-0.3mm) ont été additionnés de 30ml d'éthanol et puis mis à agiter pendant une heure. La solution a ensuite été centrifugée et 20ml du surnageant a été titré avec une solution de NaOH (0.05M) en utilisant la phénolphthaleine comme indicateur coloré.

Cette analyse a été réalisée sur l'ensemble des échantillons de l'étude de stockage.

3.3.3 SPME (Solid-phase-microextraction)

3.3.3.1 Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse SPME

Etude de stockage

Pour le suivi de l'évolution des composés d'arômes pendant stockage, les échantillons sous forme paddy et cargo, ont été transformés en riz blanchi, puis broyé grossièrement. Trois grammes de riz ont ensuite été pesés dans un vial de 10ml, celui-ci a été fermé hermétiquement avec un bouchon septum PolyTetraFluoroEthylene/Silicone (PTFE/Si). Les vials ont été conservés à 4°C jusqu'à l'analyse SPME.

Etude de broyage

Pour l'étude de la libération du 2AP en fonction de la taille des particules, les échantillons ont été broyés avec différents broyeurs, afin d'obtenir différentes granulométries de farine de riz. En tout 4 tailles ont été analysées en SPME ; grains entiers et des grains broyés avec les broyeurs Cemotec, Perten et Cyclotec pour obtenir respectivement des granulométries de 1mm, 0.5-0.3mm et <0.3mm. Trois grammes de riz ont été pesés dans un vial puis fermé à l'aide d'un bouchon septum.

Etude de traitement thermique

Pour étudier l'effet de la température, les échantillons ont subi des traitements thermiques à différentes températures (20, 40, 60, 80 et 100°C) avec ou sans eau. La quantité d'eau ajoutée (0.5, 0.75, 1.25 et 2ml) a été ajustée pour qu'il n'y ait pas d'excès d'eau après le traitement. De plus, une cuisson complète de riz dans 100ml d'eau pendant 20 min, a été réalisée.

Les quantités d'eau ajoutée à 1,5 g

de riz ainsi que le temps des traitements sont indiqués dans Tableau 4. Les échantillons ont été

Tableau 4: Paramètres utilisés pour les traitements thermiques

Variété	Temps	Quantité d'eau	Température
Aychade	10 min	0,5 ml	20°C
		0,75 ml	40°C
		1,25 ml	60°C
		2 ml	80°C
	20 min	100ml	100°C
		100ml	100°C
Fidji	10 min	0,5 ml	20°C
		0,75 ml	40°C
		1,25 ml	60°C
		2 ml	80°C
	20 min	100ml	100°C
		100ml	100°C
Giano	10 min	0,5 ml	20°C
		0,75 ml	40°C
		1,25 ml	60°C
		2 ml	80°C
	20 min	100ml	100°C
		100ml	100°C

chauffés directement dans les vials disposés dans un bloc en aluminium sur une plaque chauffante. Les vials ont été fermés immédiatement après le chauffage et agités, si nécessaire, pour mélanger l'échantillon.

Etude de l'effet du traitement chimique

Pour étudier l'effet de différentes solutions de sels ainsi que de différentes valeurs de pH, les grains de riz entier ont été mis dans différentes solutions ; tampon acétate (pH 4, 0,2M), tampon phosphate (pH 7, 0,2M), tampon carbonate-bicarbonate (pH 10, 0,2M), solution de NaCl à 3M, solution de CaCl₂ à 3M et à 4M. A 1,5g de riz ont été additionné 0,5ml de solution puis analysé directement en SPME.

Tous les échantillons ont été réalisés en triples, afin de réaliser une analyse statistique de nos résultats.

3.3.3.2 Conditions analytiques

Les fibres SPME sélectionnées sont des Supelco 50/30µm DiVinylBenzene/Carboxen/PolyDiMethylSiloxane (DVB/Carboxen/PDMS) pour appareillage automatisé. Avant la première utilisation, la fibre a été conditionnée à 270°C pendant une heure. De plus, la fibre a été mise à désorber à 250°C durant 4 min avant chaque analyse. Les conditions d'extraction SPME utilisées sont :

Température du travail :	80°C
Temps d'équilibre :	5 min
Temps d'extraction :	15 min
Temps de désorption :	4 min

Chaque série d'échantillons a été commencée avec un échantillon blanc (vial vide) pour limiter toute pollution. Tous les échantillons ont été préparés de manière à limiter au maximum les temps d'attente. Ils ont été placés de manière aléatoire dans le passeur. Une solution de collidine (2,3,5-triméthylpyrazine) dans du méthanol (1µg/ml) a été utilisée pour vérifier l'état de la fibre. 1ml de la solution a été mis dans un vial et analysé en même temps que la série des échantillons au début, au milieu et à la fin de l'analyse, de manière à pouvoir comparer les résultats obtenus. Les réponses de la collidine pour le premier prélèvement (temps 0) sont déterminées comme standards. L'aire de 2AP pour les analyses suivantes est donc calculée par la formule suivante :

$$Aire(1)_{\text{corrigé}} = Aire(1)_{\text{mesuré}} \cdot \frac{Aire(\text{étalon})_{\text{standard}}}{Aire(\text{étalon})_{\text{mesuré}}}$$

3.3.3.3 Chromatographie gazeuse

Pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse un chromatographe *Agilent serie 6890* couplé à un spectromètre de masse *Agilent serie 5973N* a été utilisé. Un passeur automatique d'échantillons *CTC, modèle Combi Pal* piloté par le programme *Cycle Composer Version 1.5* a été utilisé pour le passage automatique des échantillons.

Les conditions chromatographiques sont :

Colonne :	DB-5MS, 60m de long, 0,32mm de diamètre interne et 0,25µm d'épaisseur
Température d'injection :	250°C
Programmation du four :	Température initiale de 50°C suivi d'une augmentation de la température de 6°C/min jusqu'à 220°C puis fini par un isotherme à 220°C pendant 5min.
Débit de gaz vecteur :	1ml/min
Impact Electronique :	70 eV
Température de la source :	150°C
Gamme de masse :	40-250uma

4 Résultats et Discussion

4.1 Caractérisation de la matière première

Les trois variétés de riz étudiées sont assez proches quant à leur teneur en protéines et en matière sèche. Aychade se distingue toutefois des autres variétés par une teneur en amylose supérieure et une température de gélatinisation plus élevée (Tableau 5).

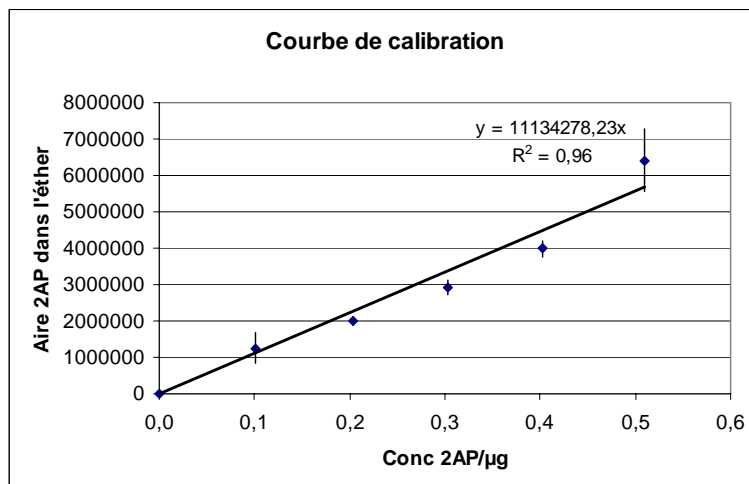
Tableau 5: Teneur en amylose, protéines, température de gélatinisation et matière sèche pour les variétés Aychade, Fidji et Giano

Variété	Teneur en protéines (% de la base sèche)	Matière sèche	Teneur en amylose (% de la base sèche)	Température de gélatinisation (°C)
Aychade	9.0	88.7	24.4	63.7
Fidji	9.2	87.3	20.9	53.0
Giano	9.1	88.6	20.0	55.6

4.2 Mise au point des méthodes

4.2.1 Courbe de calibration

Afin de pouvoir calculer la teneur en 2AP extraite par SPME à partir des aires mesurées par chromatographie, nous avons réalisé une courbe de calibration par la méthode d'ajout dosé (Figure 3). Un volume fixe d'une solution de 2AP (éther), à différentes concentrations, a été ajouté à 3 grammes de riz non-aromatiques grossièrement broyés.



Les concentrations de 2-acetyl-1-pyrroline peuvent être calculées par la relation:

$$c(2AP) = \frac{Aire(2AP)}{11134278.23}$$

Figure 3: Courbe de calibration de 2AP

La volatilité de notre molécule est fortement relié au solvant utilisé pour fabriquer la solution mère de 2AP. L'éther aboutit à de aires relatives pour le 2AP bien plus faible que pour l'eau. Il a donc été nécessaire de trouver le rapport entre les aires de 2AP dans l'éther et dans l'eau. Ne disposant pas d'une solution de 2AP dans l'eau, nous avons déterminée l'influence du solvant à l'aide d'une molécule très proche structurellement, le 2-acetylpyrrole. L'aire

mesurée de 2-acétylpyrrole dans l'eau est divisée par celle mesurée dans l'éther. Ce rapport, moyen, calculé pour deux concentrations en 2-acétylpyrrole différentes, est de 2,01. Nous avons donc appliqué ce facteur correctif aux résultats bruts de 2AP obtenus dans la solution d'éther.

4.2.2 Coefficient de partage de 2-acétyl-1-pyrroline dans du riz

Une étude a été menée pour savoir s'il existe une différence entre les coefficients de partage pour les différentes variétés, ceux-ci ont été déterminés selon la méthode décrite par Atlan et al. (2006), adapté à notre méthodologie (SPME, échantillons secs). Le principe de base est qu'à l'équilibre, la concentration en 2AP dans la fibre est donnée par la formule suivante :

$$\frac{1}{C_{fibre}} = \frac{1}{C_0 \cdot K_{fibre}} \cdot \beta + \frac{1}{C_0 \cdot K_{fibre} \cdot K_{gaz}} \quad (1)$$

Où :

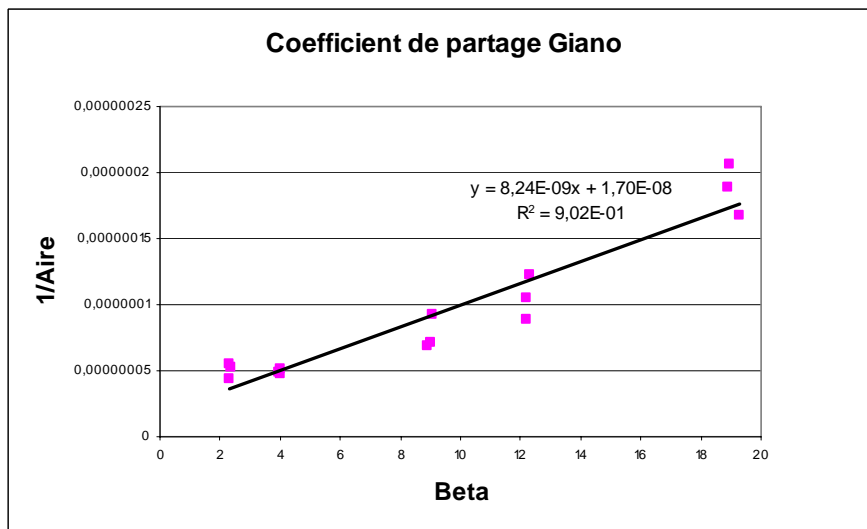
C_0 : Concentration de 2AP initiale dans le riz

K_{fibre} : Coefficient de partage entre l'espace de tête et la fibre = $C_{fibre}/C_{espace\ tête}$

K_g : Coefficient de partage entre la matrice et l'espace de tête = $C_{espace\ tête}/C_{matrice}$

β : Le rapport entre le volume gazeuse et la volume du matrice = $V_{espace\ tête}/V_{matrice}$

Le principe est de faire varier β puis mesurer l'aire de 2AP correspondante, à partir de l'équation (1). Le coefficient de partage est calculé en divisant la pente par la valeur de l'abscisse à l'origine.



Pour la variété Giano, les résultats obtenus pour la méthode PRV (phase-ratio-variation) (Figure 4), nous ont permis de calculer le coefficient de partage.

$$K_g = \frac{8.24 \cdot 10^{-9}}{1.70 \cdot 10^{-8}} = 0.48$$

Figure 4: Détermination du coefficient de partage pour la variété Giano

Le coefficient de partage pour les autres variétés est respectivement de 0.37 et 0.21 pour Fidji et Aychade. Si les coefficients de partage sont significativement différents pour les 3 variétés, la libération de 2AP se fait plus facilement pour la variété Giano.

4.3 Etude de stockage

4.3.1 Evolution des composés d'arôme du riz

Après l'extraction SPME, l'identification des composés d'arôme les plus importants, présents dans le riz de départ a été réalisé (Figure 5). Le composé majeur au niveau quantitatif est le nonanal. L'hexanal, l'éthylbenzène et le 2-acetyl-1-pyrroline sont aussi présent en grande quantité, alors que les autres molécules sont présentes à une teneur très faible au début du stockage. Le benzène est probablement une pollution qui est coélué avec le hexan-1-ol, car nous ne l'avons pas retrouvé sur d'autres chromatogrammes.

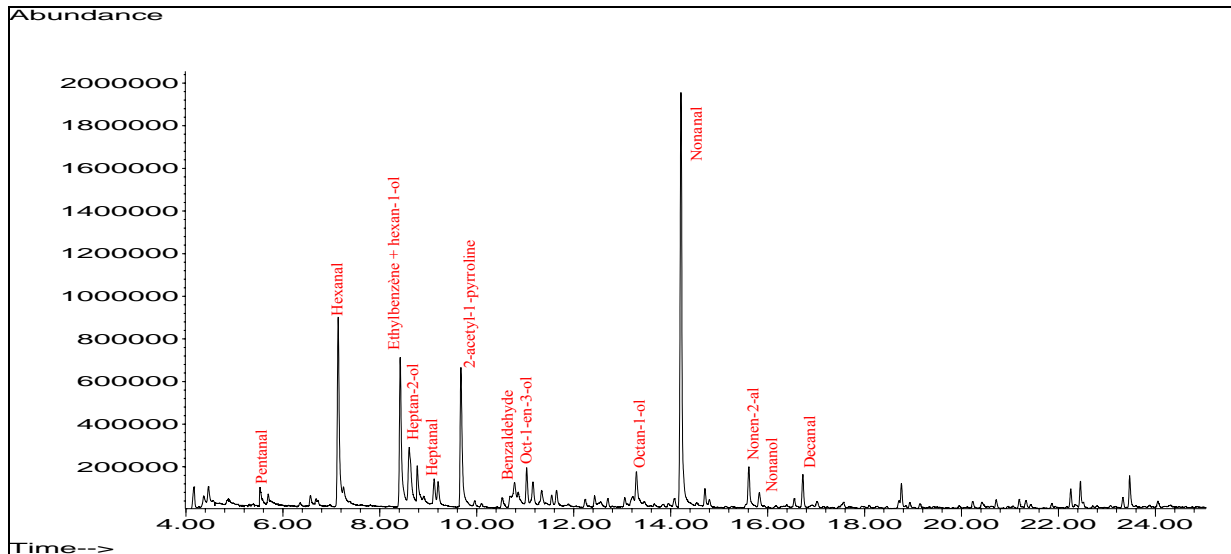


Figure 5: Chromatogramme pour la variété Aychade à temps 0.

Les composés que nous avons choisis suivre pendant le stockage sont l'hexanal et le nonanal pour voir s'il se produit une oxydation de la matière grasse au cours du stockage ainsi que le 2AP qui donne aux riz ses caractéristiques aromatiques.

La teneur des composés d'arômes est différente pour les trois variétés. La teneur en hexanal est plus faible pour Fidji et identique pour les deux autres variétés, alors que la teneur en nonanal est semblable pour Fidji et Giano mais doublé pour Aychade (Tableau 6). La teneur en 2AP pour la variété Giano est plus faible que pour Fidji et Aychade qui se ressemblent. C'est, cependant, Aychade qui contient la teneur la plus élevée.

En ce qui concerne la détermination de la concentration de 2AP dans les riz aromatique, la concentration calculée dans notre étude est entre 173 à 291 ppb au départ pour le riz sec. Ces teneurs sont du même ordre de grandeur que celles trouvés par Widjaja et al. (1996) et Yoshihashi (2002) dans le riz aromatique.

Les chromatogrammes des composés d'arôme de Fidji et Giano sans délai de stockage sont fournis en annexe 1.

Tableau 6: Les quantités de Hexanal, 2AP et Nonanal pour trois variété de riz au début de stockage

Variété	Aire de Hexanal	Concentration de 2-acetyl-1-pyrroline (ppb)	Aire de Nonanal
Aychade	24·10 ⁶	291	53·10 ⁶
Fidji	13·10 ⁶	282	28·10 ⁶
Giano	25·10 ⁶	173	24·10 ⁶

Au cours du stockage à 20°C, une augmentation de la teneur en hexanal, confirmé par ANOVA, est observé. Cette augmentation est plus importante pour la forme blanchie, qui augmente d'un facteur de 6 à 10 en fonction de la variété. L'augmentation de cette teneur est nettement moins marquée lorsque l'on observe les riz sous forme paddy et cargo (augmentation d'un facteur de 2 à 3) (annexe 2). Les autres composés créés par oxydation des lipides, nonanal, heptanal, pentanal et decanal ainsi que les alcools, 1-octen-3-ol et 1-octanol, semble également avoir des teneurs qui augmentent, celle-ci étant également plus marqué pour la forme blanchie (Figure 6). Lorsque les riz sont stockés sous forme paddy et cargo, les aldéhydes (nonanal, heptanal, pentanal, et decanal) subissent une légère augmentation alors que les alcools (1-octen-3-ol et 1-octanol) ne subissent aucune variation. Ces résultats peuvent s'expliquer par deux hypothèses ; soit la balle et le son créent une barrière qui empêche l'oxygène de pénétrer dans l'intérieure des grains. Cette hypothèse ne nous explique pas pourquoi on voit une perte de 2AP, qui est une molécule considérablement plus grande que l'oxygène. Soit l'usinage libère des enzymes responsables à l'oxydation et lipolyse des lipides.

Widjaja et al. (1996) ont obtenus des résultats similaires. Ils ont observés une production de composés créés par oxydation moins importante pour les formes paddy et cargo que pour la blanchie. Wongpornchai et al. (2004), ont montrés que la teneur en hexanal se double en 3 mois de stockage pour du riz sous forme paddy.

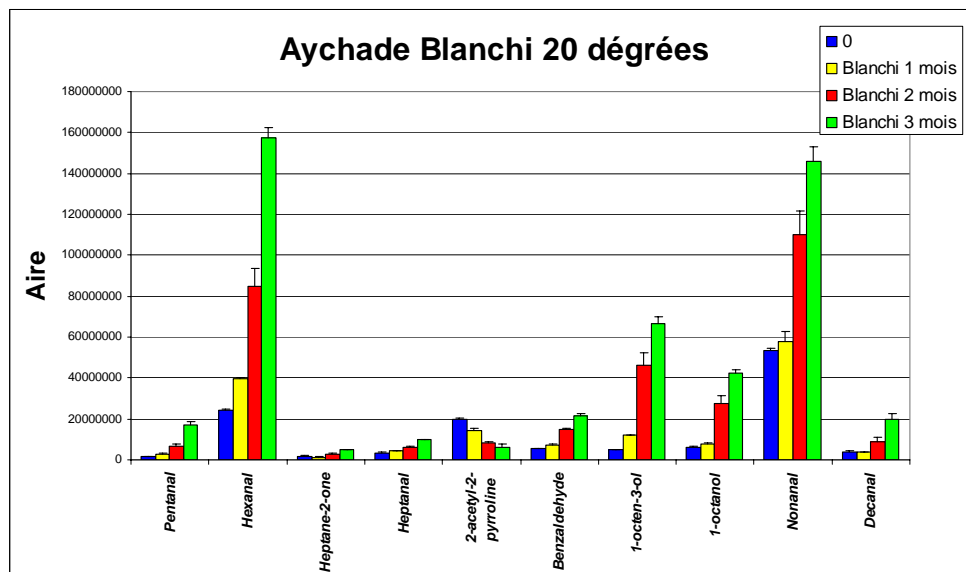


Figure 6: Evolution de la teneur en différents composés d'arôme pendant 3 mois de stockage pour la variété Aychade transformé en blanchi et stocké à 20°C

Pour les trois variétés, la teneur en 2AP diminue significativement au cours du stockage à 20°C, (Figure 7).

Cette observation est valable pour les trois variétés quelques soit le type d'usinage étudié. Les pertes étant de la même grandeur, la balle et le son n'ont donc aucun effet sur la rétention de ce composé. Ces observations sont en accord avec les résultats de Widjaja et al (1996) qui n'observent également aucun effet de l'usinage.

A 4°C, les composés d'arôme sont tous relativement stables. On voit une légère diminution en nonanal pour la variété Aychade (annexe 2), mais pas pour les autres variétés. En général la teneur en 2-acetyl-1-pyrroline augmente significativement pour un stockage à 4°C (Figure 7).

L'effet de la température sur la perte de 2AP a également été étudié par Yoshihashi et al. (2005). Les conclusions de ces études sont identiques aux nôtres. Lorsque le riz est stocké à basse température, la perte de 2AP est limitée. Pour les températures plus élevées, une perte rapide de 2AP est observée. Ces auteurs qui ont utilisé une extraction par solvant pour mesurer la concentration en 2AP, n'ont pas observés l'augmentation de 2AP à 4 degrés. Par conséquent l'augmentation du 2AP pendant stockage à 4°C obtenue pourrait être liée à la méthode analytique.

Nous avons tenté d'expliquer ce phénomène par plusieurs hypothèses.

Si l'humidité relative dans la chambre froide où les échantillons ont été stockés, est plus élevée que l'humidité d'origine, le riz va absorber plus d'eau. Une teneur en eau plus importante, donne une aire de 2AP plus élevée, car on sait que l'ajout d'eau favorise la libération du 2AP. La teneur en eau a été déterminée pour la variété Giano après 2 mois de stockage à 4°C. Une variation négative de 2% a été constatée, cette dernière ne permet donc pas d'expliquer cette augmentation du 2AP au cours du temps.

Une seconde hypothèse était une dégradation de l'amidon. Mais il est prouvé que l'amidon est une matière très stable qui se dégrade très lentement pendant stockage (Chrastil 1990; Sung *et al.* 2008). De plus, cette dégradation est encore plus lente quand on le stocke à basse température (Zhou *et al.* 2007).

Cependant, une modification de la structure du riz suite au stockage pourrait expliquer ce phénomène. En effet, une telle modification peut causer des différences de texture après cuisson pouvant induire une libération du 2AP plus facile. Il est connue, que pendant stockage, la protéine majeure du riz se lie soit à l'amidon soit aux autres protéines (Chrastil 1990) et entraîne une différence dans la texture après cuisson.

Dans un essai visant à augmenter la rétention du 2AP, Tulyathan et al. (2008) ont étudié différents emballages pour leur efficacité à retenir le composé pendant stockage. Ils ont observé une meilleure conservation de 2AP en emballant les riz de OPP/AI/LLDPE laminé et mis sous vide, comparé au stockage dans un emballage de polypropylène.

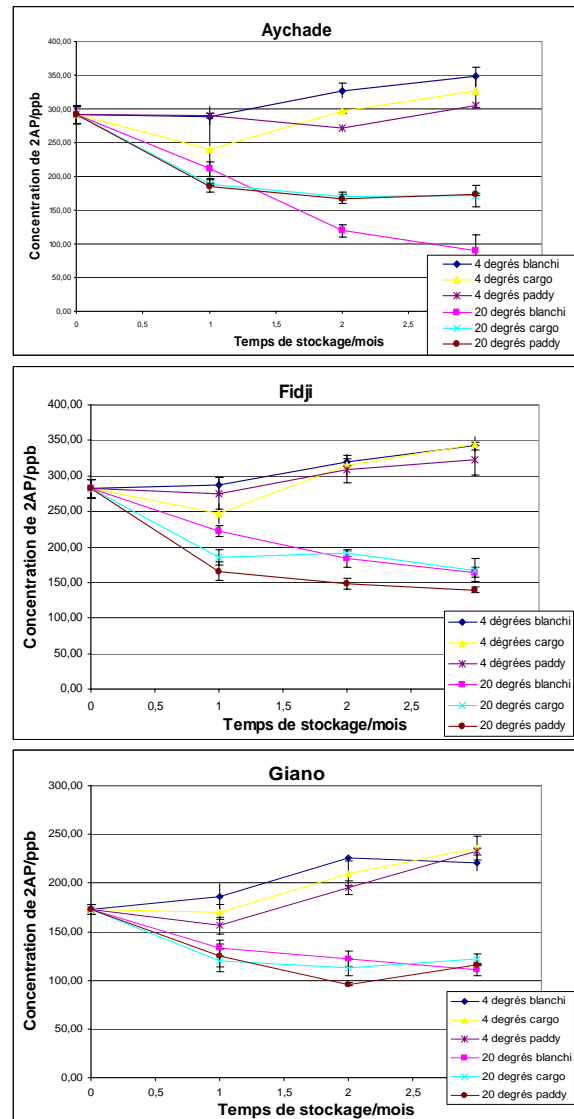


Figure 7: Concentration de 2AP pendant 3 mois de stockage pour 3 variétés

4.3.2 Détermination de l'acidité grasse

A 20°C, l'acidité grasse augmente significativement avec la durée de stockage (Figure 8). Cette augmentation est bien plus importante lorsque le riz est stocké sous forme blanchie que les formes cargo et paddy.

Les échantillons stockés à 4°C ont un degré d'acidité grasse un peu plus faible que ceux stockés à 20°C. Cependant, cet effet n'a pas pu être montré pour la variété Aychade.

L'évolution de l'acidité grasse, ne peut pas directement être reliée à l'analyse des composés d'arôme. Pour la forme blanchie stockée à 4 et 20°C nous montrons qu'il se passe une dégradation des lipides en acides gras, alors que pour l'analyse en CPG on ne voit pas d'augmentation en produits d'oxydation pour la forme blanchie stockée à 4°C. Une légère augmentation en produits d'oxydation pour tous les usinages stockés à 20°C est observée, alors qu'il n'y a pas d'augmentation en acidité grasse.

La dégradation des lipides dans nos échantillons peut se passer de plusieurs façons. Soit par une lipolyse, qui transforme les lipides en acides gras, causée par les lipases. Puis par une oxydation des acides gras causée par les lipoxygénases (Belitz *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2003) soit par une réaction chimique en présence d'oxygène à température ambiante (autoxydation) ou activé par la lumière (photooxydation). La différence que l'on observe entre nos résultats, peut donc être due aux différentes activités enzymatiques ; la lipase est activée à 4 et à 20°C, alors que le lipoxygénase n'est active qu'à 20°C. Ou bien due à une influence de lumière (les riz stockés à 20°C étaient exposés à plus de lumière) qui a activée l'oxydation chimique des riz.

La forte augmentation de l'acidité observée pour les formes blanchies, est probablement due à la libération des lipases venant du son. Les formes cargo et paddy n'ont pas été suffisamment transformé pour que les lipases soient libérées et il est donc possible que le mécanisme de ces enzymes soit peu ou nullement en contact avec le substrat.

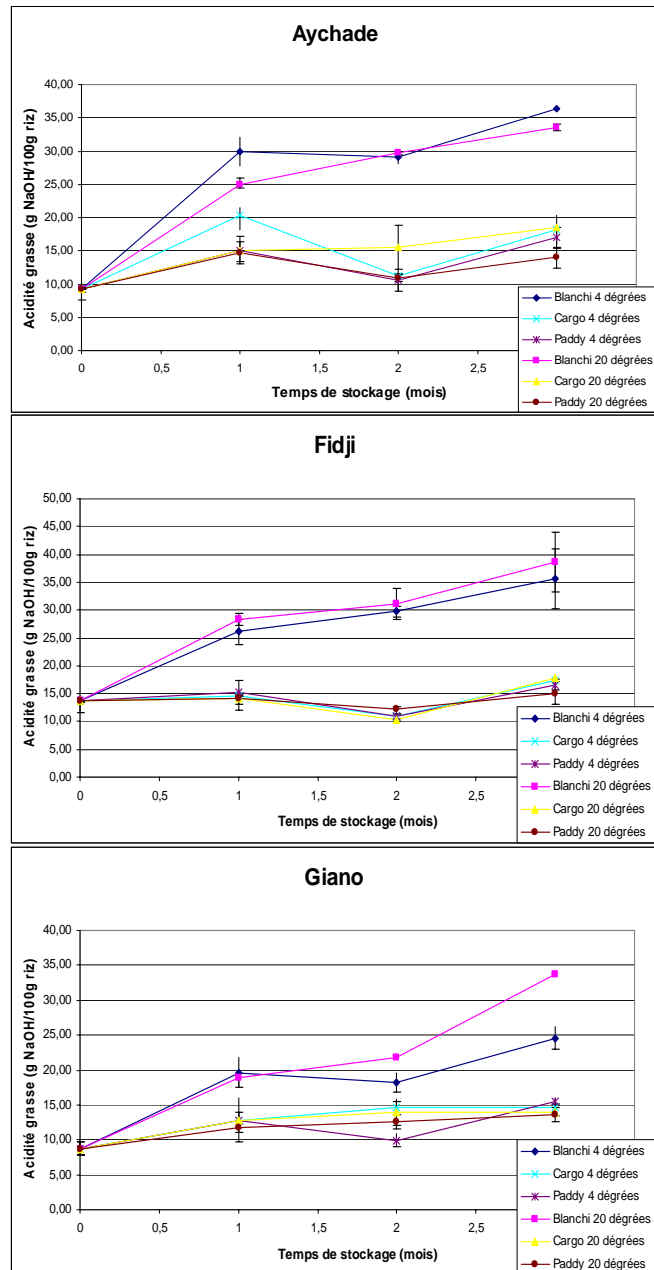


Figure 8: Acidité grasse en fonction du temps de stockage pour les 3 variétés de riz

4.4 Broyage

Pour étudier la libération du 2AP, de l'hexanal et du nonanal en fonction de la granulométrie de la poudre de riz, nous avons broyés le riz à différents degrés (1mm, 0.5-0.3mm et <0.3mm) pour les trois variétés, puis analysé et quantifié par SPME, la teneur en 2AP des différents échantillons.

La Figure 9, montre la libération du 2AP en fonction de la finesse des particules. La libération de 2AP augmente lorsque la taille des particules diminue. Pour une granulométrie >0.5mm (broyeur Perten) la libération du 2AP est deux fois supérieure à celle des grains entiers. Un broyage plus fin que 0.5mm n'augmente pas significativement la libération de 2AP.

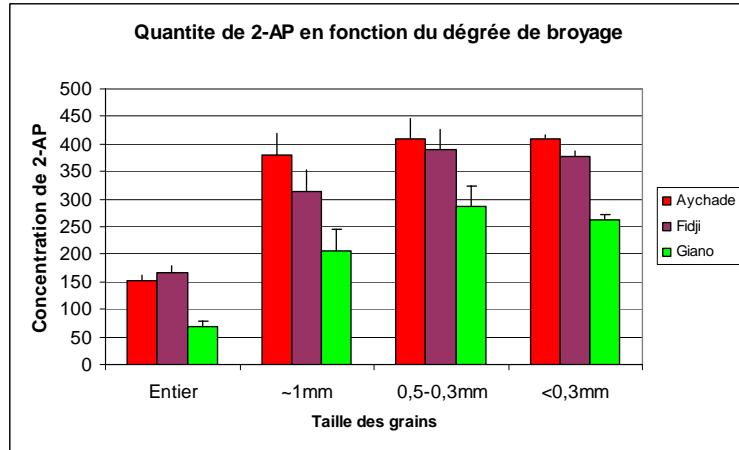


Figure 9: Aire de 2AP en fonction de la taille des particules de riz aromatiques pour trois variétés de riz

Des résultats similaires ont été trouvés par Grimm et al. (2001) et Laguerre et al. (2007) sur des grains entiers et des grains broyés grossièrement. Yoshihashi (2002) n'a également pas trouvé d'effet de la taille des particules entre une taille de 0,12 et 1mm.

Cette expérience nous a appris que la libération de 2AP ne dépend pas beaucoup de la taille des particules, une fois que le riz a été broyé. Le point déterminant est donc le chauffage de l'échantillon préalablement à l'analyse SPME et pas la grandeur de la surface d'échange entre les particules et de l'air.

Au niveau analytique, on atteint une extraction de 2AP maximale en broyant les riz jusqu'à une taille inférieure à 0.5mm. Néanmoins, la faible différence qui existe entre la taille 1mm et 0.5mm nous a amené à sélectionner pour la suite de l'étude, une granulométrie de 1mm, pour des raisons de simplicité et de praticité du broyage.

Contrairement au 2AP, la libération de l'hexanal et du nonanal augmente régulièrement avec la finesse des particules et est maximale pour des particules inférieure à 0.3mm (Figure 10).

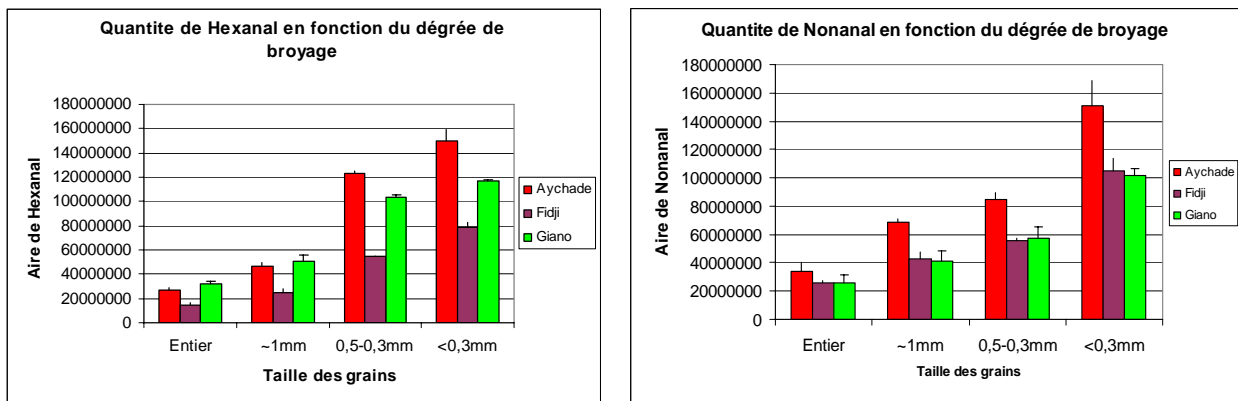


Figure 10: Quantité d'Hexanal et de Nonanal libéré en fonction de la taille des grains de riz pour les trois variétés

Les augmentations observées pourraient être due à l'oxydation des lipides après le broyage. L'oxydation dépend en effet de la surface d'échange accessible, car la vitesse d'oxydation peut être très rapide s'il existe assez d'oxygène et que la surface est grande.

4.5 Traitement Thermique

Dans le but d'étudier l'effet de la gélatinisation sur la libération du 2AP, nous avons analysé la teneur en 2AP résiduel dans des échantillons de riz chauffés avec et sans eau. Ces analyses ont été faites à différentes températures pendant une durée de 10 min. De plus, nous avons fait une analyse sur un échantillon de riz cuit dans un excès d'eau pendant 20 min.

Les résultats de cette étude sont montrés sur Figure 11.

Les échantillons secs ne montrent aucune perte significative de 2AP pendant le chauffage. La liaison entre le 2AP et le riz entier est donc assez forte pour éviter une perte du composé en chauffant, à sec, le riz. Ces résultats sont surprenants car on sait que la chaleur favorise la libération de 2AP (Grimm *et al.* 2001). Nous avons par ailleurs vu que le coefficient de partage à 80°C est assez élevé, et donc qu'une grande partie du 2AP aura dû être perdu lors du chauffage. Cependant, l'échantillon n'a été chauffé que pendant 10 min et il est donc possible qu'en si peu de temps le 2AP n'a pas été libéré.

En présence d'eau, la teneur en 2AP mesurée par SPME est 3 à 6 fois plus élevée. La différence que l'on observe entre des échantillons secs et les échantillons humides est probablement dû à la présence d'eau et à la gélatinisation de l'amidon. Dans les échantillons secs, l'amidon est toujours dans son état natif et la liaison entre le 2AP et l'amidon est toujours très forte, donc la libération est freinée. Cette écart n'est pas causé par une formation de 2AP via réactions de Maillard au cours de la cuisson, mais dû à une ouverture des hélices d'amylose et d'amylopectine. Ces résultats correspondent par ailleurs avec des résultats obtenus par Laguerre *et al.* (2007) et Grimm *et al.* (2001).

Pour les trois variétés, le chauffage entre 60 et 80°C provoque une très forte libération du 2AP. Le traitement de cuisson réalisé de 20 à 60°C n'induit pas de changement significatif dans la libération de 2AP, puis la perte du 2AP observé après 80°C n'est pas significativement plus important si la température de la cuisson est augmentée. Cette perte correspond à la température où la gélatinisation de l'amidon commence pour les trois variétés (Tableau 5, p. 11).

Cela nous indique que le 2AP est complexé à l'amidon. Une gélatinisation désorganise la structure cristalline et détruit les complexes, libérant aussi les molécules complexées.

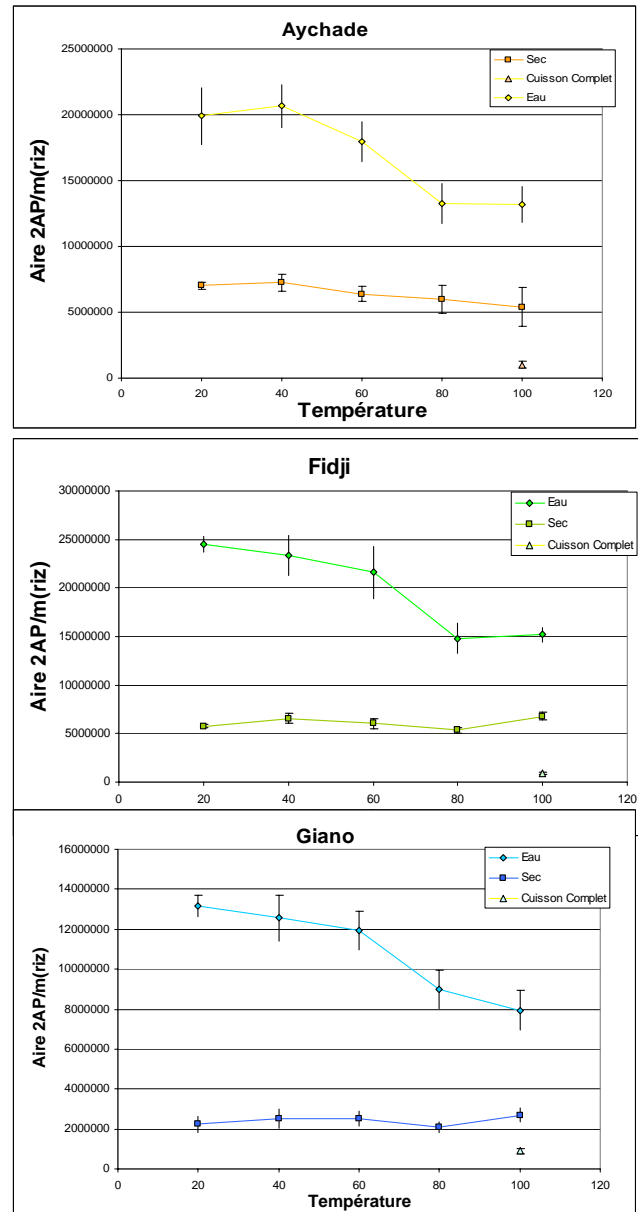


Figure 11: La quantité libéré de 2AP pour Aychade, Giano et Fidji en fonction de la température, pour des échantillons secs, additionnés de l'eau et pour une cuisson complet.

L'amidon est en effet capable de complexer de nombreuses molécules et en particulier des arômes dans des préparations alimentaires (Conde-Petit *et al.* 2006). Ces complexes neo-formés sont toutefois différents de ceux pouvant exister dans le grain natif de type A, dont les le diamètre interne des hélices sont trop petites (diamètre interne 0.35nm (Zobel and Stephen 1995)) pour permettre la pénétration de molécules complexes. Celles-ci peuvent toutefois être situées entre les hélices comme la postulé Rondeau-Mouro et al. (2004).

Une cuisson complète entraine une perte de 2AP de plus que 90%, cependant, cette cuisson est faite dans une très grande quantité d'eau (100ml) pendant 20 min. Cette expérience n'est donc pas comparable à une cuisson réelle où le rapport entre la quantité de riz et d'eau est bien plus faible.

La perte d'hexanal et de nonanal a aussi été étudiée au cours du traitement thermique. La perte d'hexanal en fonction de la température pour les échantillons de riz secs et humides est reportée sur Figure 12. La

teneur en hexanal diminue de façon régulière en fonction de la température pour les échantillons secs. Contrairement pour les échantillons contenant de l'eau, une perte est observée dès 40°C. Cette perte est identique de 40 à 80°C. A 100°C la perte est nettement moins prononcé que les échantillons précédents. Cette observation est étonnante, mais observé pour les trois variétés ainsi que pour le composé nonanal.

Contrairement au 2AP, la diminution importante de la teneur en hexanal et nonanal ne correspond pas à la température de gélatinisation. Ces molécules ne sont donc surement pas liées à l'amidon avec les mêmes caractéristiques que le 2AP.

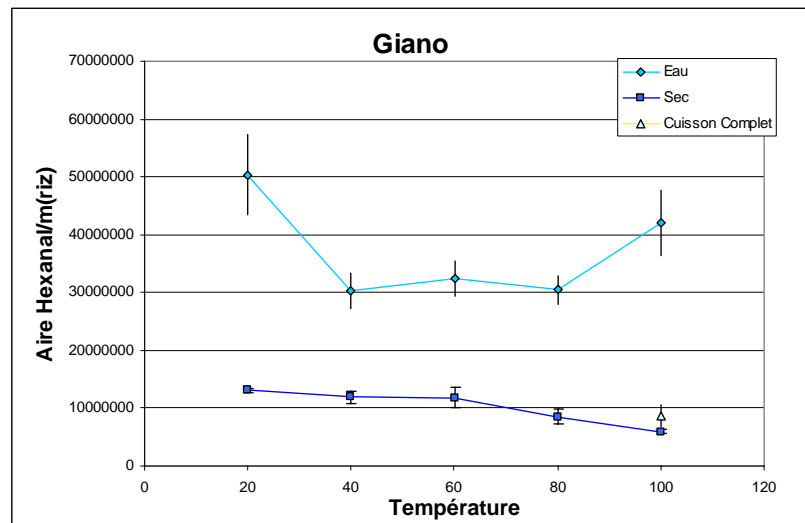


Figure 12: Aire de hexanal en fonction de la température pour la variété Giano, pour des échantillons secs, additionné de l'eau et une cuisson complète

Contrairement au 2AP, la diminution importante de la teneur en hexanal et nonanal ne correspond pas à la température de gélatinisation. Ces molécules ne sont donc surement pas liées à l'amidon avec les mêmes caractéristiques que le 2AP.

Dans l'étude, le protocole de préparation des échantillons a entrainé de fortes variations entre les répétitions des échantillons additionnés de l'eau. L'écart type élevé est probablement due au temps d'attente pour les échantillons avant l'analyse SPME.

L'échauffement d'un échantillon ajouté d'eau suivi par un refroidissement entraine des transformations même à basse température. La fermeture du vial ne stabilise pas l'échantillon et selon l'ordre dans laquelle l'échantillon est analysé a pu donner des variations pour la teneur en composés d'arôme. Les échantillons pouvaient, en effet, attendre jusqu'à 24h avant l'analyse.

Pour diminuer cet effet du temps d'attente, nous avons positionné les échantillons aléatoirement pour l'analyse. Les résultats obtenus sont donc fiable et l'analyse statistique ANOVA a confirmé les changements que l'on voit.

4.6 Traitement Chimique

Pour voir l'effet de différents sels ainsi que de différents pH sur la libération de 2AP, divers solutions ont été mélangés aux trois variétés de riz, Aychade, Giano et Fidji. Dans ce cas, nous avons utilisé, comme témoin, un échantillon de riz ajouté de l'eau. Le pH a une très forte influence sur l'extraction du 2AP (Figure 13). La libération du 2AP croît avec le pH. Elle est très faible à pH 4 et maximale à pH 10. Le 2AP est, en effet, une molécule qui présente une fonction aminée. Elle est donc ionisée en milieu acide (pH 4) et possède une forte affinité avec le milieu aqueux. A l'inverse, le 2AP n'est pas ionisé en milieu basique et passe donc plus facilement dans l'espace de tête. Pour les trois variétés, le NaCl ne montre aucun effet significatif, sur la libération du 2AP, alors que le CaCl₂ libère moins de 2AP que pour de l'eau. La concentration de sel montre un léger effet sur Giano et Aychade, mais pas pour Fidji. A 4M, la libération du 2AP est plus importante qu'à 3M. Le CaCl₂ est reconnue pour sa capacité à gélatiser l'amidon à température ambiante (Ahmad and Williams 1999), devrait donc permettre une meilleure libération du 2AP. En effet, nous avons observé dans l'étude du traitement thermique, que la gélatinisation de l'amidon favorise la libération du 2AP. Nous avons donc voulu vérifier si l'amidon avait bien gélatinisé l'amidon de nos échantillons, traités avec le CaCl₂ à 3M, en faisant une analyse DSC sur des échantillons de riz ajoutés de solutions de CaCl₂ à 3 et 4M ainsi que du NaCl à 3M. Cette analyse nous a montré que la solution de NaCl augmente la température de gélatinisation de 8°C et que la solution de CaCl₂ à 4M n'entraîne aucun changement au niveau de la température de gélatinisation. Pour la solution de CaCl₂ à 3M (Annexe 3), nous n'avons pas pu mesurer la température de gélatinisation. Le thermogramme ne montre aucun pic endothermique entre 40 à 120°C, indiquant que la gélatinisation a eu lieu à une température inférieure à 40°C.

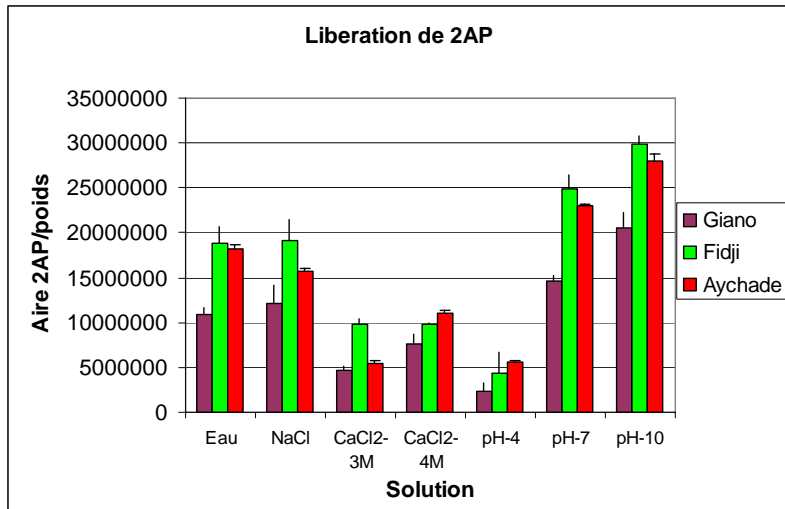


Figure 13: Teneur en 2AP en fonction de différentes solutions, eau, NaCl (3M), CaCl₂ (3M), CaCl₂ (4M), tampons de pH 4, 7 et 10 pour les trois variétés de riz

Afin de confirmer les résultats obtenus par DSC, nous avons regardé les grains d'amidon du riz sous microscope. Lorsque les grains d'amidon sont natifs, une croix de biréfringence est visible, mais une fois que l'amidon est gélatinisé cette croix disparaît (Baks *et al.* 2007). Immédiatement après le mélange, aucun des amidons n'étaient gélatinisés. Mais après une demi-journée la seule solution qui ne montrait plus de croix de biréfringence était le CaCl₂ à 3M. Confirmant ainsi les résultats obtenus en DSC : l'amidon de riz est bien gélatinisé en présence de CaCl₂ à 3M, mais ne l'est pas en présence de CaCl₂ à 4M.

La gélatinisation de l'amidon à froid (CaCl₂ à 3M) ne permet donc pas la libération du 2AP. Le résultat infirmait l'hypothèse d'une complexation entre 2AP et l'amidon, à moins que le sel en a un deuxième effet sur le 2AP. En effet, celui-ci peut aussi favoriser l'ionisation du 2AP, empêchant ainsi sa volatilisation. Pour valider l'hypothèse de la complexation, il faudrait extraire l'amidon de riz en condition douce (à froid par solvant organique) et doser le 2AP dans l'amidon purifié. Si le 2AP est complexé, il sera quantitativement dosable dans l'amidon purifié. Cet essai sera réalisé très prochainement.

5 Conclusion et Perspectives

Ce rapport expose, dans un premier temps, les changements de riz aromatiques au cours du stockage. Les échantillons ont été stockés à différentes températures, ainsi que sous différents formes d'usinage. Nous avons étudiés l'évolution des composés d'arôme et de l'acidité grasse.

Les composés d'arômes que nous avons évalués en particulier, sont le 2AP, l'hexanal et le nonanal. Ces composés étant en quantité plus importante que d'autres. Nous avons observé une perte rapide et significative du 2AP pour un stockage à température ambiante (20°C). Cette perte est indépendante du degré d'usinage. Contrairement au stockage à 20°C, une légère augmentation est observée pour le stockage à basse température (4°C). Nous n'avons trouvé aucune explication pour ce phénomène, mais on suppose qu'il est lié à la méthode utilisée.

Quant à la teneur en hexanal et nonanal, nous avons observé une augmentation significative pour un stockage à température ambiante. Cette augmentation s'est montrée plus importante pour la forme blanchie, que pour paddy et cargo. Pour le stockage à 4°C, nous n'observons aucun changement. Ces observations nous indiquent qu'à 20°C, une oxydation des acides gras a eu lieu. Cette oxydation est freinée par la présence du son et de la balle, ainsi qu'à une basse température. Les mécanismes responsables sont probablement l'activité de l'enzyme liopxygenase et l'autoxydation.

Au cours du stockage, l'acidité grasse augmente pour le riz stocké sous forme blanchie, indépendamment de la température. Les formes paddy et cargo semblent avoir un mécanisme protecteur contre la réaction lipolytique créant des acides gras libres. Ceux sont probablement les enzymes lipase, qui sont responsables, car ils se trouvent dans le son et l'usinage va donc les libérer.

Dans un deuxième temps, le rapport expose les effets de la libération du 2AP en fonction d'un changement structurel du riz.

Le changement de granulométrie a un effet sur la libération du 2AP. Lorsque les grains sont broyés, ils libèrent deux fois plus de 2AP que les grains entiers. Après broyage, la libération du 2AP n'augmente pas en fonction de la taille des particules.

Une gélatinisation de l'amidon de riz favorise la libération du 2AP. Nous avons observé une diminution en quantité de 2AP entre 60 et 80°C en présence d'eau, correspondant à la température de gélatinisation. Avant 60°C et après 80°C la perte de 2AP n'était pas significative. Nous avons également constaté qu'un échauffement des grains entiers de riz, sans ajout d'eau, ne libère pas le 2AP. Cette observation nous a indiqué que le 2AP pourrait bien être lié à l'amidon, car il est libéré lorsque l'on provoque un changement de la structure cristalline de l'amidon.

Les différentes solutions ajoutées aux grains de riz ont une influence importante sur la libération du 2AP. La teneur en 2AP libérée augmente avec le pH. Un milieu acide entraîne une ionisation du 2AP et augmente son affinité pour des solutions aqueuses. Dans un milieu basique le 2AP se volatilise plus facilement. Sachant que le CaCl₂ peut gélatiniser l'amidon à température ambiante, nous avons été surpris de voir qu'une solution de CaCl₂, ne favorise pas une libération du 2AP, malgré une gélatinisation avérée de l'amidon. Nous tirons donc la conclusion que l'effet de cette solution est masqué par un effet secondaire pour l'affinité du 2AP.

D'autres théories restent encore à vérifier au niveau de la liaison entre le 2AP et le riz. Une fois le mécanisme qui lie le 2AP au riz est déterminé, il sera envisageable d'optimiser les conditions de stockage en limitant la perte de cet arôme dans le riz aromatique.

6 References

- Adams A, De Kimpe N (2006) Chemistry of 2-acetyl-1-pyrroline, 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine, 2-acetyl-2-thiazoline, and 5-acetyl-2,3-dihydro-4H-thiazine: Extraordinary Maillard flavor compounds. *Chemical Reviews* **106**, 2299-2319.
- Ahmad FB, Williams PA (1999) Effect of salts on the gelatinization and rheological properties of sago starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3359-3366.
- Arvisenet G, Le Bail P, Voilley A, Cayot N (2002a) Influence of physicochemical interactions between amylose and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7088-7093.
- Arvisenet G, Voilley A, Cayot N (2002b) Retention of aroma compounds in starch matrices: Competitions between aroma compounds toward amylose and amylopectin. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* **50**, 7345-7349.
- Atlan S, Trelea IC, Saint-Eve A, Souchon I, Latrille E (2006) Processing gas chromatographic data and confidence interval calculation for partition coefficients determined by the phase ratio variation method. *Journal of Chromatography A* **1110**, 146-155.
- Baks T, Ngene IS, van Soest JJG, Janssen AEM, Boom RM (2007) Comparison of methods to determine the degree of gelatinisation for both high and low starch concentrations. *Carbohydrate Polymers* **67**, 481-490.
- Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P (2004) 'Food Chemistry.' (Springer).
- Biais B, Le Bail P, Robert P, Pontoire B, Buleon A (2006) Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas. *Carbohydrate Polymers* **66**, 306-315.
- Bruechert LJ, Zhang Y, Huang TC, Hartman TG, Rosen RT, Ho CT (1988) Contribution of lipids to volatiles generation in extruded corn-based model systems. *Journal of Food Science* **53**, 1444-1447.
- Buttery RG, Ling LC, Juliano BO (1982) 2-Acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice. *Chemistry and Industry*, 958-959.
- Buttery RG, Ling LC, Juliano BO, Turnbaugh JG (1983) Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**, 823-826.
- Champagne ET (1972) 'Rice, Chemistry and Technology.' (American Association of Cereal Chemists, Inc.).
- Chrastil J (1990) Protein-Starch Interactions in Rice Grains. Influence of Storage on Oryzenin and Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1804-1809.
- Conde-Petit B, Escher F, Nuessli J (2006) Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 227-235.

- Favino TF, Fronza G, Fuganti C, Fuganti D, Grasselli P, Mele A (1996) Penicillin acylase-mediated synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline and of 2-propionyl-1-pyrroline, key roast-smelling odorants in food. Inclusion complexes with β -cyclodextrin and their NMR and MS characterization. *Journal of organic chemistry* **61**, 8975-8979.
- Giroux HJ, Perreault V, Britten M (2007) Characterization of Hydrophobic Flavour Release Profile in Oil-in-water Emulsions. *Journal of Food Science* **72**, 125-129.
- Grimm CC, Bergman C, Delgado JT, Bryant R (2001) Screening for 2-acetyl-1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 245-249.
- Guichard E (2002) Interactions Between Flavour and Food Ingredients and their Influence on Flavour Perception. *Food Reviews International* **18**, 47-70.
- Hien NL, Yoshihashi T, Sarhadi WA, Hirata Y (2006) Sensory test for aroma and quantitative analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in Asian aromatic rice varieties. *Plant Production Science* **9**, 294-297.
- Hofmann T, Schieberle P (1998) New and convenient syntheses of the important roasty, popcorn-like smelling food aroma compounds 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine from their corresponding cyclic α -amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 616-619.
- Itani T, Tamaki M, Hayata Y, Fushimi T, Hashizume K (2004) Variation of 2-acetyl-1-pyrroline concentration in aromatic rice grains collected in the same region in Japan and factors affecting its concentration. *Plant Production Science* **7**, 178-183.
- Kimpe Nd, Keppens M (1996) Novel syntheses of the major flavor components of bread and cooked rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1515-1519.
- Kimpe NGd, Stevens CV, Keppens MA (1993) Synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, the principal rice flavor component. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1458-1461.
- Laguerre M, Mestres C, Davrieux F, Ringuet J, Boulanger R (2007) Rapid Discrimination of Scented Rice by Solid-Phase Microextraction, Mass Spectrometry, and Multivariate Analysis Used as a Mass Sensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1077-1083.
- Maraval I, Mestres C, Pernin K, Ribeyre F, Boulanger R, Guichard E, Gunata Z (2008) Odor-active Compounds in Cooked Rice Cultivars from Camargue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Mestres C, Matencio F, Pons B, Yajid M, Fliedel G (1996) A rapid method for the determination of amylose content by using Differential Scanning Calorimetry. *Starch* **48**, 2-6.
- Mestres C, Rouau X (1997) Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 147-155.

- Romanczyk LJJ, McClelland CA, Post LS, Aitken WM (1995) Formation of 2-acetyl-1-pyrroline by several *Bacillus cereus* strains isolated from cocoa fermentation boxes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 469-475.
- Rondeau-Mouro C, Le Bail P, Buleon A (2004) Structural investigation of amylose complexes with small ligands: inter- or intra-helical associations? *International Journal of Biological Macromolecules* **34**, 309-315.
- Schieberle P (1989) Formation of 2-acetyl-1-pyrroline and other important flavor compounds in wheat bread crust. In 'Thermal Generation of Aromas (ACS Symposium S.)' pp. 268-275. (American Chemical Society).
- Siebenmorgen TJ, Meullenet J-F (2004) Impact of drying, storage and milling on rice quality and functionality. In 'Rice. Chemistry and Technology'. (Ed. ET Champagne) pp. 301-328. (AACC: Minnesota, USA).
- Sirisoontaralak P, Noomhorm A (2006) Changes to physicochemical properties and aroma of irradiated rice. *Journal of Stored Products Research* **42**, 264-276.
- Sung W-C, Hong M-C, Chang T-S (2008) Effect of storage and gamma irradiation on (*Japonica*) waxy rice. *Radiation Physics and Chemistry* **77**, 92-97.
- Teo CH, Abd A, Cheah PB, Norziah MH, Seow CC (2000) On the roles of protein and starch in the aging of non-waxy rice flour. *Food Chemistry* **69**, 229-236.
- Tietz M, Buettner A, Conde-Petit B (2008) Interaction between starch and aroma compounds as measured by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS). *Food Chemistry* **108**, 1192-1199.
- Tsugita T, Kurata T, Kato H (1980) Volatile components after cooking rice milled to different degrees. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**, 835-840.
- Tulyathan V, Leecharatanaluk B (2006) Changes in Quality of Rice (*Oryza Sativa* L.) CV. Khao Dawk Mali 105 During Storage. *Journal of Food Biochemistry* **31**, 415-425.
- Tulyathan V, Srisupattarawanich N, Suwanagul A (2008) Effect of rice flour coating on 2-acetyl-1-pyrroline and n-hexanal in brown rice cv. Jao Hom Supanburi during storage. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 367-372.
- Widjaja R, Craske JD, Wootton M (1996) Changes in volatile components of paddy, brown and white fragrant rice during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **71**, 218-224.
- Wongpornchai S, Dumri K, Jongkaewwattana S, Siri B (2004) Effects of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. *Food Chemistry* **87**, 407-414.
- Wulff G, Avgenaki G, Guzman MSP (2005) Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylose. *Journal of Cereal Science* **41**, 239-249.

- Yajima I, Yanai T, M. N, Sakakibara H, Habu T (1978) Volatile flavor components of cooked rice. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**, 1229-1233.
- Yajima I, Yanai T, M. N, Sakakibara H, Habu T (1979) Volatile flavor components of cooked Kaorimai (scented rice, *O. sativa japonica*). *Agricultural and Biological Chemistry* **43**, 2425-2429.
- Yamada T, Kato T, Tamaki S, Teranishi K, Hisamatsu M (1998) Introduction of Fatty Acids to Starch Granules by Ultra-High-Pressure Treatment. *Starch-Starke* **50**, 484-486.
- Yoshihashi T (2002) Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. *Journal of Food Science* **67**, 619-622.
- Yoshihashi T, Huong NTT, Surojanametakul V, Tungtrakul P, Varanyanond W (2005) Effect of storage conditions on 2-acetyl-1-pyrroline content in aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. *Journal of Food Science* **70**, S34-S37.
- Yoshihashi T, Nguyen TTH, Kabaki N (2002) Quality evaluation of Khao Dawk Mali 105, an aromatic rice variety of Northeast Thailand. In 'JIRCAS-Working-Report.' Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). (Eds O Ito, N Matsumoto) pp. 151-160. (Tsukuba, Japan: Japan International Research Center for Agricultural Sciences.).
- Zhang Y, Yu ZL, Lu YX, Wang Y, She DH, Song M, Wu YJ (2007) Effect of the absence of lipoxygenase isoenzymes on the storage characteristics of rice grains. *Journal of Stored Products Research* **43**, 87-91.
- Zhou Z, Robards K, Helliwell S, Blanchard C (2007) Effect of storage temperature on cooking behaviour of rice. *Food Chemistry* **105**, 491-497.
- Zhou ZK, Blanchard C, Helliwell S, Robards K (2003) Fatty acid composition of three rice varieties following storage. *Journal of Cereal Science* **37**, 327-335.
- Zobel HF, Stephen AM (1995) Starch: Structure, Analysis and Application. In 'Food Polysaccharides and Their Applications'. (Ed. AM Stephen) pp. 19-66. (Dekker: New York).